

ZUM NACHWEIS VON
FURAZOLIDONRÜCKSTÄNDEN
IN KÖRPERGEWEBEN UND
-FLÜSSIGKEITEN VON KALB
UND SCHWEIN MITTELS
HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITS-
CHROMATOGRAPHIE

Harry Kalim

*Diss.
München
1985*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554826_0032

Aus dem Tiergesundheitsdienst Bayern
Bereich Lebensmittelhygiene
Leitung: Prof. Dr. W. Gedek

vorgelegt über:

Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Prof. Dr. Dr.h.c. L. Kotter)
der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

ZUM NACHWEIS VON FURAZOLIDONRÜCKSTÄNDEN
IN KÖRPERGEWEBEN UND -FLÜSSIGKEITEN
VON KALB UND SCHWEIN MITTELS
HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Harry Kalim
aus
Haiti

München 1985

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl
Referent: Prof. Dr. Dr.h.c. L. Kotter
Korreferent: Prof. Dr. A. Schmid

Tag der Promotion: 22. Februar 1985

à mes chers parents,
mon frère et mes soeurs
mes enfants et ma femme

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. LITERATURÜBERSICHT	2
1. Allgemeines über Nitrofuran-Derivate	2
2. Stoffwechselerverhalten	8
2.1 Pharmakokinetik	8
2.2 Biotransformation	13
2.3 Toxische Wirkungen von Furazolidon	19
3. Rückstandsanalytik	24
3.1 Mikrobiologische Methoden	24
3.2 Chemische Methoden	27
3.2.1 Kolorimetrie, Photometrie	27
3.2.2 Gaschromatographie	30
3.2.3 Hochdruckflüssigkeitschromatographie	31
3.2.4 Papier-, Dünnschicht- und Ionen- austauschchromatographie	35
4. Rückstandsverhalten von Nitrofuranen	37
4.1 Körperflüssigkeiten	41
4.2 Fleisch und Organe	43
III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	46
1. Problemstellung	46
2. Material	46
2.1 Furazolidon-Präparate	46
2.2 Versuchstiere und Versuchstierfütterung	47
2.3 Probenentnahme und -aufbewahrung	47

	Seite
3. Methodik	48
3.1 HPLC-Apparatur	48
3.2 Reagenzien	49
3.3 Herstellung von Eichlösungen	49
3.4 Arbeitsbedingungen	50
3.4.1 Standardabweichung von Meßergebnissen aufgrund der Einspritztechnik	51
3.4.2 Reproduzierbarkeit und Linearität von Messungen	53
3.4.3 Beurteilung der Vorversuche	55
3.5 Probenaufarbeitung	56
3.5.1 Reinigung und Vorbereitung von Geräten	57
3.5.2 Aufarbeitung von Leber-, Nieren- und Fleischproben	57
3.5.3 Aufarbeitung von Blut- und Blutplasma- proben	60
3.5.4 Aufarbeitung von Harnproben	62
3.5.5 Qualitative und quantitative Auswertung der Chromatogramme	63
3.6 Wiederfindungsraten	65
3.6.1 Künstliche Kontamination von Fleisch-, Leber- und Nierenproben	65
3.6.2 Künstliche Kontamination von heparini- siertem Blut	66
3.6.3 Künstliche Kontamination von Harn	66
3.6.4 Nachweisgrenze	84
3.6.5 Prüfung der Extrakte	84
3.6.6 Störmöglichkeiten durch andere Wirkstoffe	86
3.7 Stabilität von Furazolidon	87
3.7.1 Lichtstabilität	87
3.7.2 Stabilität von Furazolidon in Blut	89

	Seite
4.	Tierversuche 91
4.1	Versuchstier Schwein 91
4.1.1	Behandlung der Schweine 91
4.1.2	Furazolidonbestimmung im Schweineharn 92
4.1.3	Furazolidonbestimmung im Schweineblut 94
4.1.4	Furazolidonbestimmung in Schweineleber, -niere und -muskel nach oraler Verabreichung 96
4.2	Versuchstier Kalb 96
4.2.1	Behandlung der Kälber 96
4.2.2	Furazolidonbestimmung im Kälberharn 97
4.2.3	Furazolidonbestimmung im Kälberblut 100
4.2.4	Furazolidon in Leber, Niere und Muskel vom Kalb nach oraler Verabreichung von 10 bzw. 20 mg Furazolidon/kg KGW 103
IV.	DISKUSSION 104
V.	ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY 109
VI.	LITERATURVERZEICHNIS 113

I. EINLEITUNG

Nitrofuranderivate, insbesondere Furazolidon, werden in der Bundesrepublik Deutschland in großem Umfang als antibakteriell wirksame Tierarzneimittel eingesetzt. Sie haben ein breites Wirkungsspektrum, bilden kaum Resistenzen, sind gut geeignet zur Kombination mit anderen Wirkstoffen und gelten als leistungsfähige Arzneistoffe. Nicht zuletzt gehören die Nitrofurane zu den preiswertesten Tierarzneimitteln.

Wegen ihrer mutagenen Wirkung müssen sie als Arzneistoffe mit erhöhtem Risiko eingestuft werden. In der Bundesrepublik Deutschland besteht keine entsprechende Höchstmengenregelung. Für die einzelnen Präparate sind längere Wartezeiten amtlich festgesetzt.

Der zur Kontrolle auf Hemmstoffe bei Schlachttieren amtlich vorgeschriebene Test (Ausführungsbestimmungen A zum Fleischbeschaugesetz) vermag Furazolidonrückstände nicht mit der notwendigen Empfindlichkeit zu erfassen. Routinemäßig durchführbare Methoden zum Nachweis von Furazolidon-Rückständen beim lebensmittelliefernden Tier stehen nicht zur Verfügung.

Mit der vorliegenden Arbeit soll ein Beitrag zur besseren Erfassung von Furazolidonrückständen in verschiedenen Geweben sowie in Blut und Harn von Kälbern und Schweinen mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie geleistet werden.

II. L I T E R A T U R Ü B E R S I C H T

1. ALLGEMEINES ÜBER NITROFURAN-DERIVATE

a) Chemie und chemisch-physikalische Eigenschaften

5-Nitrofurane kommen in der Natur nicht vor. Sie sind synthetische Chemotherapeutika, die weltweit Anwendung finden.

Grundsubstanz ist der durch Nitrierung von Furfurol gewonnene 5-Nitro-furanaldehyd-(2).

Furazolidon ist chemisch eine Schiffsche Base aus 5-Nitro-furfurol und 3-Amino-2-oxazolidon.

Die Nitrofuran-Derivate stellen blaß oder tiefer gelbgefärbte Kristalle dar, die sich, besonders in Lösung, durch hohe Lichtempfindlichkeit auszeichnen. Sie lösen sich in Wasser recht langsam und nur zu einem geringen Teil auf und weisen einen bitteren Geschmack auf. Löslich sind diese Verbindungen in organischen Lösungsmitteln, wie z.B. Dimethylformamid oder Dimethylsulfoxid. Die Aktivität ist in sauren Medien (Furaltadon) höher als in basischen (Nitrofurantoin) (BREINLICH, 1964).

b) Wirkungsmechanismus und antibakterielle Aktivität

Die Nitrofurane besitzen alle eine ähnliche Wirkung und analoge Wirkungsmechanismen. Sie blockieren lebenswichtige metabolische Vorgänge der Zelle des Mikroorganismus (MARTIN, 1958; GRISK, 1967).

Besonderes Augenmerk verdient die Hemmung wichtiger Enzyme. Allgemein werden ein Eingriff in die Protein-

synthese und eine Beeinflussung der Cytoplasmamembran der Mikroorganismen vermutet. Die Nitrofurane verlängern die Ruhephase und halten so die Teilung der Zelle hin (EHRHARD und RUSCHING, 1972; WALTER und HEILMEYER, 1976).

Obwohl dieser Aspekt des Wirkungsmechanismus der Nitrofurane in der Literatur besonders herausgestellt wird und fast die Lehrmeinung darstellt (ROTENBERG, 1977; zitiert nach MCCALLA, 1979), schließt MCCALLA (1979) wichtigere Eingriffspunkte der Nitrofurane nicht aus.

TATSUMI et al. (1977) sowie MCCALLA (1979) untersuchten in vitro und in vivo die Bindung verschiedener Nitrofurand-erivate und ihrer aktiven Metaboliten an Bakterien- und Körperzellen-DNS, -RNS und -Proteinen. Diese werden geschädigt und ihre Synthese wird gehemmt.

Mit Furoxon inkubierte Bakterien zeigten in vitro, neben der Teilungshemmung, auch eine umfangreiche Schädigung der Feinstruktur. Verklumpung und Vakuolenbildung im Kern, Ablösung der cytoplasmatischen Membran von der Zellwand, Plasmaaustritt aus dem sich auflösenden Bakterienleib wurden beobachtet (NEGELE, 1974).

Die Wirkung der Nitrofurand-erivate richtet sich gegen verschiedene gramnegative und grampositive Bakterien. Bestimmte Nitrofurane sind in vitro oder in vivo auch gegen Pilze und große Viren (MARTIN, 1958), Clostridien (SMITZ, 1972), Mykoplasmen (BUIRKAMP et al., 1978; HARTMAN et al., 1981) und Protozoen wie Kokzidien (GYLSTORFF, 1978), Leukozytozoen (MANUEL und TROVELA,

1977), *Trypanosoma evansi* (GOEL und SINGH, 1971) und *Trypanosoma cruzi* (DOCAMPO et al., 1981) wirksam.

Keime, die gegenüber Antibiotika resistent sind, blieben Nitrofuranen gegenüber meist empfindlich. STEPHAN und BULLING (1973) untersuchten Salmonellenstämme auf Resistenzen gegen Antibiotika und Nitrofurane. Die Salmonellen waren zu 92,9% gegen Tetracyclin, 35,3% gegen Ampicillin, 16,3% gegen Chloramphenicol, 8,8% gegen Kanamycin, 0,8% gegen Nitrofurazon und 0,4% gegen Furazolidon resistent.

Die von FANKHAUSER et al. (1981) nachgewiesenen *E. coli*-Stämme bei Kälbern waren gegen Chloramphenicol, Spektinomycin, Gentamicin, Ampicillin, Erythromycin, Oxytetracyclin, Sulfamethazin resistent und nur gegen Nitrofurazon empfindlich.

In therapeutischen Konzentrationen wirkt Furazolidon in vitro und in vivo bakterizid, in niedrigen auch bakteriostatisch gegen grampositive und gramnegative Bakterien, wie Salmonellen (GYLSTORFF und DORN, 1956; PAUL und PAUL, 1964; SINGH, 1968; PERRY et al., 1972; OJO und AHANIHU, 1974), *E. coli* (SZABO und GÜNTHER 1968; BARTOS et al., 1972; BESSARABOV et al., 1973; DEVRIESE, 1975; HABRDA et al., 1977), Staphylokokken (DEVRIESE, 1975), Vibrionen (DAVIS, 1961), Enterokokken, Streptokokken, Pasteurellen, *B. anthracis*, Clostridien, *Proteus*, Pilze, Klebsiellen, Flagellaten (PIETSCH et al., 1975), Kokzidien (IVANOVA und MANDRUSOV, 1966; GYLSTORFF, 1978; SUAREZ et al., 1980) sowie Listerien (PIETSCH et al., 1975).

BILIC und ZUTIC (1979) ermittelten die Resistenz von *E. coli*, isoliert aus Schweinen. Sie fanden, daß von den Isolaten 9% gegen Furazolidon, 15% gegen Trimethoprim-Sulfonamid, 44% gegen Streptomycin, 48% gegen Chloramphenicol, 82% gegen Sulfonamide und 94% gegen Oxytetracyclin resistent waren.

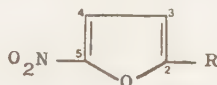
FISHER und DE LA FUENTE (1971) zitierten einen Report of Edinburgh and East of Scotland Veterinary Investigation Service (1968). Danach lag der Anteil der E. coli-resistenten Fälle bei der Behandlung von Kälberdurchfällen bei nur 10% für Furazolidon, bei 29% für Chloramphenicol, bei 34% für Neomycin, 91% für Tetracyclin und 93% für Streptomycin (FISHER und DE LA FUENTE, 1971).

E. coli-Stämme aus Legehennenbeständen bilden ebenfalls kaum Resistenzen gegen Furazolidon. Nach BARTOS und LEBDUSKA (1975) waren nur 4% der Stämme gegen Furazolidon, jedoch 74 bis 79% gegen Chlortetracyclin resistent.

c) Indikationen

Wegen ihres breiten antimikrobiellen Wirkungsspektrums werden besonders häufig Derivate des 5-Nitrofurans angewendet. Die Nitrogruppe in Position 5 des Furanringes, der bereits in Position 2 einen Substituenten besitzt, führt zur Verbindung mit bakterizider Wirkung. Die Nebenketten sind für die pharmakologische Aktivität verantwortlich (ROBERT, 1958).

Der Furanring hat folgende Struktur:



GILMANN und WRIGHT entwickelten 1930 das 5-Nitro-2-furaldehyd, das erste 5-Nitrofuran.

DODD und STILLMAN entdeckten 1944 die antimikrobielle Eigenschaft des Nitrofurazons, das sich zunächst bei in vitro-Versuchen als vielversprechend erwiesen hatte. An Militärärzte geschickt, die zu dieser Zeit mit einer zunehmenden Anzahl massiv infizierter Wunden konfrontiert waren, bei denen Sulfonamide und Penicilline un-

wirksam erschienen, wurde Nitrofurazon sofort als hoch wirksam in "vivo" gefunden und erfolgreich eingesetzt.

Fast gleichzeitig untersuchten DANN und MÖLLER (1947) in Deutschland die bakteriostatische Wirkung der Nitrothiophene und Nitrofurane.

Wegen ihrer Wirksamkeit kommen mehrere Abkömmlinge des 5-Nitrofurans in der Veterinärmedizin allein oder in Kombination mit anderen Pharmaka zur Anwendung. Antibiotisch wirkende Präparate enthalten häufig ein oder sogar zwei Nitrofurane (PETZ, 1982 a).

Die Nitrofurane werden entweder lokal oder systemisch zur Prophylaxe und Therapie in der Massentierhaltung, u.a. über Fütterungsarzneimittel, eingesetzt.

Das Furazolidon (Furoxon) hat von den 5-Nitrofuranen bei weitem die größte Bedeutung. Es machte in den USA ungefähr 97% der 5-Nitrofurane aus, die beim lebensmittel-liefernden Tier eingesetzt wurden (BRYAN, 1978). Es dient, wie die weiteren Vertreter dieser Gruppe, hauptsächlich zur Behandlung von Magen-Darm-Erkrankungen und von Infektionskrankheiten bei Geflügel, Kälbern, Rindern, Schweinen und Fischen, z.B. von Salmonellose, Coccidiose, Coli-Infektion, Furunkulose (Forellen), Bauchwassersucht (Karpfen), Mastitis und Uteruserkrankungen bei Kühen.

GLINSKI und KOWALSKA (1976) analysierten die Wirkung und Persistenz einiger Nitrofurane (darunter Furazolidon) im Honig und im Zuckersirup, der an Honigbienen verfüttert wurde.

OMER (1978) beschrieb die erfolgreiche lokale Therapie von Verbrennungen, Verletzungen, Wunden und bakteriellen Dermatosen mit Furazolidon bei Affen, Pferden und Hunden. Ebenso erfolgreich verlief die Behandlung einer infektiösen Keratoconjunctivitis bei Rindern und Schafen.

In einem Bericht der Kommission der Europäischen Gemeinschaften an den Europa-Rat vom Juni 1983 wurden die Wirkstoffe genannt, die zur Zeit für die Zubereitung von Vormischungen für Fütterungsarzneimittel verwendet werden dürfen. Von den Nitrofuranen wurde nur das Furazolidon erwähnt.

In Anlage II dieses Berichts werden die Wirkstoffe, die zur Zeit zum gleichen Zweck verwendet werden, aufgeführt. Neben dem Furazolidon wurden Furaltadon (Altafur), Nifurprazin (Carofur), Nihydrazon, Nitrofurazon (Furacin) und Nifursol genannt.

Furaltadon ist wenig verträglich, nicht ganz so wirksam wie Furazolidon und wird des öfteren zur Trinkwassermedikation eingesetzt. Das Präparat ist in Deutschland nicht im Handel und wurde in den USA am 16.11.1961 auf Veranlassung der F.D.A. mit der Begründung: " The efficacy of the drug was not sufficient to warrant further use in view of the possible side effects" aus dem Handel gezogen (WALTER und HEILMEYER, 1976).

Nifurprazin wurde vor allem in den Kälbermast-, Schweine- und Geflügelbetrieben eingesetzt. Das breite Wirkungsspektrum, die bereits bei nur geringfügig höherer Dosierung auftretende bakterizide Wirkung und die anstandslose Aufnahme vom Tier waren die wesentlichen Vorzüge. Nach Angaben des Herstellers in der Bundesrepublik Deutschland ist die Produktion von Nifurprazin seit ca. fünf bis sechs Jahren eingestellt worden.

Nihydrazon wurde 1963 in den USA zugelassen. 1976 schlug die FOOD and DRUG ADMINISTRATION vor, die Anwendung dieses Präparates und anderer, wie Nitrofurazon, Furalolidon, Furaltadon, im Veterinärbereich zurückzunehmen (BRYAN, 1978).

Nitrofurazon wurde als Coccidiostaticum verwendet, ist aber zu diesem Zweck seit 1963 wegen der allergenen Nebenwirkungen verboten. Die Resorption ist gering, so daß die Anwendung daher überwiegend lokal erfolgt (Mastitis-Präparate).

Nitrofurantoin (Furadantin) wird in der Humanmedizin häufig erwähnt. Dieses Nitrofuran wird sehr gut resorbiert und größtenteils unverändert über die Nieren ausgeschieden. Es dient zur Behandlung von Harnwegsinfekten. Ein Veterinärpräparat mit Nitrofurantoin ist in Deutschland nicht bekannt.

2. STOFFWECHSELVERHALTEN

2.1 P h a r m a k o k i n e t i k

Resorption und Exkretion der Nitrofurane sind sowohl von ihren physikochemischen Eigenschaften, als auch von der Spezies und der Dosis abhängig. Im Vergleich zu anderen Tierarten wird Nitrofurantoin bei Ratten schlecht resorbiert. Der nach oraler Verabreichung erreichte niedrige Blutspiegel ist nicht allein der schlechten Resorption zuzuschreiben, da die mit dem Urin bei Ratten ausgeschiedene Substanzmenge nach oraler oder i.v. Applikation gleich hoch ist. Eine Erhöhung der oralen Dosis bewirkt nicht zwangsläufig eine Erhöhung des Blutspiegels (PAUL et al., 1960). BUZARD et al. (1961) gaben die Serumhalbwertszeit für Nitrofurantoin und Furaltadon bei Ratten mit 25 bzw. 33 Minuten an.

Furazolidon ist schlecht wasser- und lipidlöslich und wird nur relativ gering resorbiert (MARTIN, 1958). Nach oraler Applikation von täglich 10 mg/kg KGW Furazolidon (über drei Tage) an Kälber konnten PIETSCH et al. (1978) den maximalen Blutspiegel innerhalb der ersten zwei Stunden p. appl. nachweisen; 24 Stunden p. appl. waren keine Blutspiegel mehr nachweisbar. Bei der Kombination von Furazolidon mit Huminsäure verschob sich der Maximalwert von der zweiten auf der sechsten Stunde nach der Applikation.

Die niedrigen Blutspiegelwerte der Nitrofurane sind entweder der schlechten Resorption und/oder der schnellen Metabolisierung und der renalen Ausscheidung zuzuschreiben. Die Höhe der Ausscheidung durch Harn und Kot variierte mit dem Derivat und war speziesabhängig. Die renale Exkretion wurde mit 5% für Nitrofurazon und 52% für Nitrofurantoin angegeben, obwohl beide Substanzen ähnliche Löslichkeit und vergleichbare Plasmakonzentration aufweisen (PAUL et al., 1960).

Bei Ratten betrug die Furazolidonausscheidung durch den Harn nur 1%. Beim Hund und beim Menschen war Furazolidon nur in Spuren im Harn nachweisbar (BUZARD, 1962). Je höher die Dosierung von Furazolidon bei Ratten lag, desto höher war die Ausscheidung durch den Kot (PAUL et al., 1960; BUZARD, 1962).

Die Plasmaproteinbindung der Nitrofurane ist abhängig von der Ionisierung. Sie betrug bei nicht ionisierten Nitrofuranen (Furazolidon, Nitrofurazon) ca. 30%, beim Nitrofurantoin (anionisch) zwischen 50 und 90%. Es be-

stand jedoch keine apparente Korrelation zwischen der Höhe der Plasmabindung und den systemischen antibakteriellen Eigenschaften (PAUL et al., 1960; SWAMINATHAN und LOWER, 1978).

Die Nitrofurane verteilten sich ungefähr zu gleicher Konzentration in die Lymphe und ins Plasma. Niedrigere Konzentrationen wurden regelmäßig in der Galle, in der Milch und in der zerebrospinalen Flüssigkeit gefunden. Eine generelle Akkumulation in Geweben wurde aufgrund der schnellen Resorption, der schnellen Metabolisierung und der Exkretion nicht angenommen. In den meisten Geweben kommen nitrofuranabbauende Enzyme vor (MARTIN, 1958; PAUL et al., 1960). Mit Ausnahme von Blut bauen alle Körpergewebe Furazolidon komplett ab (beim Menschen 100 mg/kg Gewebe/Stunde). Deshalb gab es keine Akkumulation im Gewebe (GYLSTORFF, 1978).

Mit einer Dosierung von 20 mg Furazolidon/kg KGW erzielten MÜLLING und HENNING (1971) beim Kalb Plasmakonzentrationen von ca. 1,4 - 1,6 mg/l.

YAMAMOTO et al. (1978) gaben die Furazolidon-Halbwertszeit im Schweineserum mit 45 Minuten an und stellten fest, daß nach oraler Applikation von 100 mg/kg KGW sich ein höherer Anteil des Furazolidons im Harn als in der Gallenflüssigkeit, im Magen oder im Serum wieder auffinden ließ.

Furazolidon in therapeutischer Dosierung im Hühnerfutter führte nur zu geringen Blut- und Gewebespiegeln bei Masthühnern und Legehennen. Sechs bis acht Stunden nach der Applikation sank der Gehalt von Furazolidon im Blut stark ab und zwei Tage nach dem Absetzen des Medikaments waren sowohl das Blut als auch die untersuchten Organe frei von Spuren des eingegebenen Wirkstoffes (KRIEG und

LÖLIGER, 1973). Dieses Ergebnis bestätigten RITCHIE et al. (1977) und SUGDEN et al. (1983).

NEGELE (1974) fand nach Applikation von 100 mg Furazolidon pro Kilogramm Fischgewicht (400 g schwere Regenbogenforelle) in den ersten zwei bis sechs Stunden einen Serumspiegel von durchschnittlich 1,2 mg/l, welcher dann im Zeitraum von der zehnten bis zur 16. Stunde auf einen Mittelwert von 2,8 mg/l anstieg. Nach 24 Stunden wurden nur noch 0,3 mg/l gemessen. Fünf bzw. zwei Tage nach einer 20-tägigen Medikation von 35 mg Furazolidon/kg Regenbogen- und Bachforelle bzw. Cutthroatforelle und Bachsaiblinge war das Medikament nicht mehr nachweisbar. Die Nachweisgrenze der verwendeten Bestimmungsmethode lag bei 0,1 mg/kg.

Bei Ziegen wiesen PANDY et al. (1978) 45% bzw. 27% der gesamten oral verabreichten Dosis von 10 mg/kg KGW Nitrofurantoin bzw. Furazolidon zwischen der ersten und der zwölften Stunde p. appl. im Harn nach.

ARTEM'EVA (1964) fand keinen Unterschied in der Ausscheidungsgeschwindigkeit von Furazolidon bei Kaninchen (20 mg/kg KGW) und fünf bis zehn Tage alten Entenküken (4-5 mg/Tier). Zwischen der dritten und der 24. Stunde p. appl. traten meßbare Blutspiegelwerte auf, während die höchste Konzentration in Leber und Galle sechs Stunden p. appl. nachweisbar war. Im Körpergewebe gab es keinen Kumulationseffekt.

Unter Anwendung radioaktiv markierter Substanzen untersuchten mehrere Autoren das Verhalten verschiedener Nitrofurane im tierischen Körper. TATSUMI et al. (1973 a und b) bestätigten die unterschiedliche Resorption der Nitrofurane über den Magen-Darm-Trakt und stellten fest, daß auch die von einem Nitrofuran gebildeten Metaboliten unterschiedlich resorbiert wurden. Die höchste Wiederfindungsrate der verabreichten Radioaktivität wurde bei

Ratten in der Vena portae gefunden.

TATSUMI und TAKAHASHI (1982) verabreichten oral eine einmalige Dosis von 10 mg ^{14}C -Furazolidon/kg KGW an Ratten und ermittelten nach 24 Stunden 47,7% bzw. 36,6% der verabreichten Dosis im Urin bzw. im Kot. Furazolidon wurde also schnell ausgeschieden. Hinsichtlich des Umfangs des Metabolismus fanden die Untersucher nach 48 Stunden 0,05% unverändertes Furazolidon im Urin, 0,5% im Kot und 0,05% in der Galle, und kamen zu dem Schluß, daß Furazolidon in Ratten beinahe vollständig metabolisiert wurde.

Ähnliche Resultate ergaben die Untersuchungen von GYLSTORFF (1978) nach Verabreichung von 0,022% markiertem Formyl- ^{14}C -NF-180 (Furazolidon) an Hühnern. Es wurde festgestellt, daß alle Proteine des Serums und die Aminosäure aus dem Hydrolysat der Leberproteine radioaktiv markiert waren. Furazolidon wurde bis zu dem natürlichen Grundstoff metabolisiert und dann im Stoffwechsel des Organismus weiterverarbeitet (GYLSTORFF, 1978).

GYLSTORFF (1978) untersuchte auch die Langzeitrückstände von NF-180 in Küken und stellte fest, daß die markierten Rückstände länger als fünf Tage nach Absetzen vorhanden waren. Rückstände in Leber und Niere benötigten 20 Tage bis zu einem Rückgang auf 0,1 mg/kg und die in den Muskeln benötigten 30 Tage.

Nach den Befunden in der Literatur ist die Exkretion der Nitrofurane nicht eindeutig. In ihrem Verhalten liegt kein System. Zum einen ist das Ausmaß der Ausscheidung von charakteristischen Eigenschaften der Substanz und der als Testobjekt dienenden Spezies weitgehend abhängig, zum anderen wird der Ausscheidungsmodus auch durch die im Plasma oder den Geweben erfolgenden chemischen Veränderungen bedingt, zumal die ermittelte Radioaktivität der

Gewebe meist gering ist - schneller Metabolismus und Exkretion - und die Wechselbeziehung zwischen Geweben spezifischer Aktivität und Organeigenheiten nicht festgestellt werden konnte (SWAMINATHAN und LOWER, 1978).

2.2 B i o t r a n s f o r m a t i o n

Die schnelle Biotransformation der 5-Nitrofurane in Geweben lebensmittelliefernder Tiere wurde durch die Verteilungs- und Exkretionsstudien, und durch direkte biochemische Analyse bestätigt. Ihre Abbauege sind vielfältig und die toxikologische Bedeutung der entstehenden Metaboliten ist kaum bekannt.

Untersuchungen an Zellkulturen und Labortierern haben ergeben, daß der wichtigste metabolische Angriffspunkt die Nitrogruppe in Position 5 des Furanringes ist (SWAMINATHAN und LOWER, 1978; AUFRERE et al., 1978). An der Nitroreduktion sind in tierischen Geweben verschiedene Enzyme beteiligt. Die Wirkung des ubiquitär vorkommenden Xanthinoxidase und seines Hemmers Allopurinol wurde in vitro und im vivo untersucht. Xanthinoxidase baute das Nitrofuran z.B. in intestinaler Mucosa ab und Allopurinol verminderte wirkungsvoll seinen Abbau. Dabei schien die intestinale Mikroflora keine Rolle zu spielen (TATSUMI et al., 1973 a und b). Hohe Enzymaktivität wurde in der Leber, Niere, Lunge, Milz, Skelettmuskulatur und im Gehirn gefunden (BENDER und PAUL, 1951). OLIVARD et al. (1962) analysierten die Nitroreduktion bei Kaninchen.

Auch NADPH-Cytochrom C-Reduktase ist an der Reduktion der Nitrofurane beteiligt. Die Behandlung von Ratten mit Phenolbarbital führte zu einer Erhöhung der hepatischen NADPH-Cytochrom C-Reduktase und dadurch zu einer Steigerung der mikrosomalen Nitroreduktion der

Nitrofurane (SWAMINATHAN und LOWER, 1978).

Die reduktive Wirkung von Aldehydoxydase auf Nitrofurazon wurde auch untersucht. Sie ist wie die Xanthinoxidase ein Metalloenzym und ist im Cytosol lokalisiert. Ihre Enzymaktivität wurde nicht gehemmt durch Allopurinol, Kohlenmonoxyd und Dikumarol. Das Enzym zeichnete sich auch durch seine Unfähigkeit, NAD^+ als Elektronenakzeptor zu nutzen, aus.

Eine Reduktion an der NO_2 -Gruppe unter Aufbrechen des Furanringes wurde durch Bakterienenzyme verursacht. MCCALLA (1979) berichtete über die Isolierung von drei verschiedenen Nitrofuran-Reduktasen bei *E. coli*. Reduktase I bewirkte unter aeroben Bedingungen und in Gegenwart von NADH oder NADPH eine Aufspaltung des Nitrofuranringes und die Bildung von 4-Cyan-2-oxobutyraldehyd. Reduktase IIa und IIb aktivierten Nitrofurazon unter anaeroben Bedingungen zur Bildung von Zwischenprodukten, die die DNS in vitro zerstörten, cytotoxisch und mutagen wirkten (SWAMINATHAN und LOWER, 1978).

Der Mechanismus der Nitroreduktion der Nitrofurane ist nicht genau bekannt. Jedoch der erste Schritt schien durch Elektronenübertragung die Bildung von freien Radikalen unter aeroben Bedingungen zu sein. Die dabei entstandenen Superoxide und Peroxide wirkten cytotoxisch. Im anderen Falle konnten unter Protonenübertragung Nitro- und Dihydroxyamino-Derivate entstehen, wobei letztere unter Wasserverlust zu Nitrosoverbindungen führten (SWAMINATHAN und LOWER, 1978).

Die Nitroreduktion führte also zwangsläufig zu Radikalanionen, Nitroso- und Hydroxylaminofuranen, die jedoch vermutlich wegen der aus ihrer hohen Reaktivität sich ergebenden Kurzlebigkeit bisher noch nicht isoliert werden konnten. Die enzymatische Spaltung des Furanringes ergab offenkettige Nitrile (AUFRERE et al., 1978). Die

Ringöffnung könnte entweder von partiell reduzierten Nitrofuranen (cis-Oxime) oder von Aminofuranen ausgehen (SWAMINATHAN und LOWER, 1978).

Nitrofurane vom "Azomethintyp" (z.B. Furazolidon, Nitrofurazon, Furaltadon) unterliegen in verdünnter Salzsäure der hydrolytischen Spaltung. Sie werden daher nach oraler Aufnahme bereits im Magen über Hydrolyse an der -CH = N-Bindung mit der Bildung von 5-Nitrofuraldehyd und der jeweiligen Aminkomponente zerfallen. Am Beispiel des Nitrofurazons führte die saure Hydrolyse zu Nitrofuraldehyd, das im Stoffwechsel zu 30% umgewandelt wurde zu nitrofuroischer Säure (erscheint auch im Urin). Wahrscheinlich wurde der Rest in Polymere transformiert (GYLSTORFF, 1978).

Für 3-Amino-2-oxazolidon, die Aminkomponente des Furazolidons, wurde ein möglicher Abbau zu 2-Hydroxyethylhydrazin diskutiert (PALM und MAGNUS, 1968). Bei Ratten führte Furazolidon zu einem irreversiblen Hemmstoff der Monoaminoxidase in Leber und Gehirn. Verantwortlich war wahrscheinlich ein Metabolit mit freier Hydrazingruppe. Er verursachte ein Vitamin-B₆-Mangel-Syndrom (ALI und BARTLET, 1980 und 1981).

TENNENT und RAY (1971) untersuchten mit C¹⁴-markiertem Furazolidon die ausgeschiedenen Metabolitenmengen (in % der Dosis) bei Schweinen und Ratten. Die chromatographische Trennung ließ 14 Peaks erkennen. Die Autoren ermittelten für einige der Metaboliten relativ kurze Halbwertszeiten zwischen 0,32 - 1,6 Stunden.

CRAINE und RAY (1972) konnten auch bei Geflügel eine Metabolisierung zu Nitrofuraldehydhaltigen Abbauprodukten feststellen; und zwar fanden sie drei unbekannte Substan-

zen und eine, die Furazolidoneigenschaften aufwies, vier weitere Komponenten, darunter Harnsäure, traten auch bei den Kontrolltieren auf. Alle Stoffe unterschieden sich in ihren spektrophotometrischen Banden.

TATSUMI und TAKAHASHI (1982) isolierten zuletzt zwei Furazolidonmetabolite aus dem Rattenurin. Metabolit I (3-(4-cyan-2-oxobutylidenamino)-2-oxazolidon), ein Cyan-Derivat, zeigte im UV-Licht Absorptionsmaximum bei 266 nm; Metabolit II (N-(5-Acetamino-2-furfuryliden)-3-amino-2-oxazolidon), erstes Beispiel für Acetaminofuran-Bildung in Furazolidon-Metabolismus, zeigte im UV-Licht Absorptionsmaximum bei 323 nm. Nach dünnsschicht-chromatographischer Trennung wurden beide Metabolite eindeutig identifiziert. Die Untersucher stellten dabei fest, daß Aminofuran ein Zwischenprodukt des Furazolidonmetabolismus darstellte.

Nitrofurane werden in der Regel rasch metabolisiert und über Urin und Faeces fast vollständig eliminiert (CRAINE und RAY, 1972; KRIEG und LÖLIGER, 1973; SWAMI-NATHAN und LOWER, 1978). Die Reduktion der Nitrogruppe der Nitrofurane wurde von fast allen Autoren als Voraussetzung für ihre antibakterielle Wirkung betrachtet. An der Nitrogruppe wurde auch die kanzerogene Aktivität der Nitrofurane verknüpft (GRISK, 1967; ERTÜRK et al., 1971). Nitrofurane waren auch in der Lage sich an zellulären Proteinen zu binden, in die Synthese und den Reparationsprozeß der Nukleinsäuren einzugreifen und morphologisch wahrnehmbare Chromosomenschäden herbeizuführen sowie erbschädigende und krebserzeugende Wirkungen zu entfalten (MCCALLA, 1979; COHEN, 1978; KLEMENCIC und WANG, 1978; OLIVE, 1978). Sie gingen auch in das foetale Gewebe über

und konnten transplazentar mutagene und karzinogene Wirkungen entfalten (BAUR, 1983).

Unter den Nitrofuranrückständen sind außerdem elektrophile Metaboliten zu vermuten. Weder über ihre chemische Natur noch über ihre Bindungsform in eßbaren Produkten liegen Angaben vor. Ebenso wenig ist bekannt, ob und in welchem Maße diese Rückstände nach Aufnahme mit der Nahrung für den Konsumenten bioverfügbar wären.

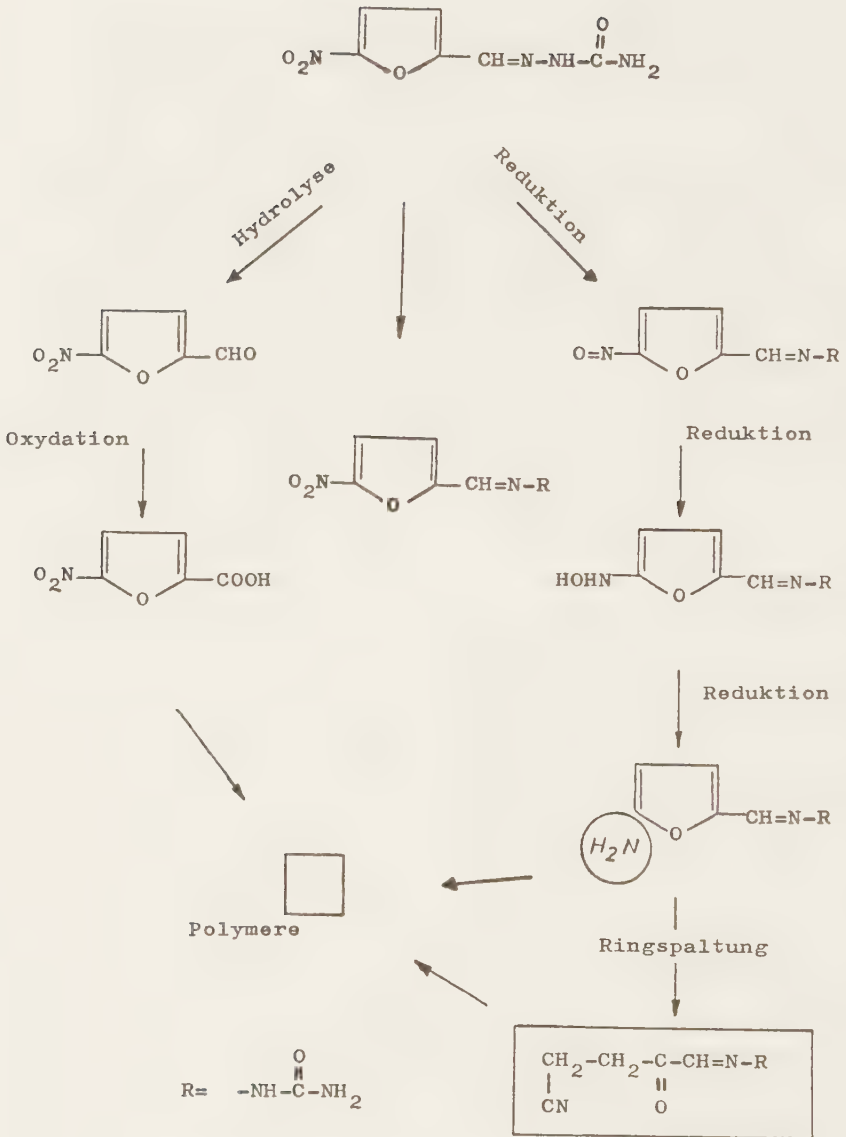


Abb. 1: Allgemeines Schema des Metabolismus der Nitrofurane am Beispiel von Nitrofurazon
(modifiziert nach PAUL et al., 1960)

2.3 Toxische Wirkungen von Furazolidon

In den üblichen pharmakologischen Tests erwies sich Furazolidon als inert (GRISK, 1967; GYLSTORFF, 1978). Alle Körpergewebe mit Ausnahme von Blut bauten Furazolidon komplett ab. Deshalb gab es keine Akkumulation im Gewebe. Jedoch eine große Anzahl von Studien berichteten über die toxischen Wirkungen von Furazolidon (KRIEG, 1972; KRIEG und LÖLIGER, 1973; GYLSTORFF, 1978).

Bei Küken beobachteten KNIVETT und TUCKER (1972) nach Applikation von 400 mg/kg Furazolidon im Futter eine schlechte Gewichtsentwicklung und Futterverwertung. Eine unspezifische Stressorfunktion ließen SIDFROV (1973) sowie SIDEROV und LÜDERS (1971) dem Furazolidon zukommen, das bei Küken einen Anstieg des Plasmacorticosteronspiegels hervorrief.

Furazolidon beeinflusst den Glykogenstoffwechsel. Eine Blockade der Glykogenolyse im Myokard wurde nachgewiesen. CZARNECKI und GRAHN (1980) wiesen nach 2- bis 5-wöchiger Applikation von 700 mg/kg Furazolidon im Futter die Entwicklung einer Cardiomyopathie sowie eine signifikante Verminderung der volumetrischen Dichte der Herzmyofibrillen bei Puten nach.

BORLAND (1979) beobachtete verschiedene Symptome bei Absatzferkeln, die prophylaktisch Furazolidon mit dem Futter aufnahmen. Der klinisch milde Krankheitsverlauf dieser Vergiftung äußerte sich durch schleppenden Gang, Nachziehen der Hinterhand, Paradeschritt, Schreckhaftigkeit, Muskelkrämpfe, Umfallen auf die Seite und Ruderbewegungen der Gliedmaßen, die durch Treiben provoziert werden konnten.

LUENGYOSLUECHAKUL (1983) untersuchte bei 12 Schweinen die Wirkung von Furazolidon bei verschiedenen Dosierungen. Körperoberflächenblutungen wurden bei der Ver-

abreichung von 10 mg/kg KGW/Tag am 50. und 51. Applikationstag beobachtet, die innerhalb von 2 Tagen spontan abheilten. Bei dieser Dosierung traten noch am 77. Tag keine ZNS-Störungen auf. Wurde die Dosierung von 10 mg/kg vom 78. Tag an auf 100 mg/kg KGW/Tag erhöht, traten innerhalb von 1 bis 2 Tagen ZNS-Störungen auf bzw. nach 7 bis 8 Tagen, wenn die Dosis auf 50 mg/kg KGW/Tag erhöht wurde. Bei der Applikation von 20 mg Furazolidon/kg KGW/Tag an vier Tieren traten am 33., 34., 35. und 42. Applikationstag ZNS-Störungen auf, die am 44., 56., 60. und 64. Tag zu ersten schweren motorischen Störungen übergingen.

Folgender pathologisch-anatomischer Befund wurde bei einem während schwerer motorischer Störungen getötetem Tier erhoben: ZNS: herdförmige submeningeale Blutungen im Bereich des Kleinhirns und der Medulla oblongata, mittelgradige Hyperämie, Plasmastase, Verdacht auf herdförmige Ganglienzelldegeneration; NIERE: einzelne Zellinfiltrate im Bereich der Markrindengrenze. Weiterhin wurden niedrigere Körpertemperaturen bei den behandelten Tieren gemessen. Statistisch signifikant höhere Hämoglobinwerte, niedrigere Thrombozytenzahlen, niedrigere Lymphozytenzahlen, höherer Bilirubin- und höherer Proteingehalt im Vergleich mit den Kontrolltieren wurden festgestellt (LUENGYOSLUECHAKUL, 1983).

Bei Kälbern wurde zwischen einer akuten und chronischen Form der Nitrofuranvergiftung unterschieden. Bei der akuten Furazolidonvergiftung zeigten sich ZNS-Störungen wie Hypersensibilität, Muskeltremor und tonisch-klonische Krämpfe, die dem Bild der hypomagnesämischen Tetanie oder der Cerebrocorticalnekrose ähnelten (DIRKSEN und HOFMANN, 1974; LILJA, 1975). Die chronische Form war durch Panzytopenie, vor allem Thrombozytopenie, Abfall der Leukozyten mit Granulozytopenie und durch spontane Hämorrhagien gekennzeichnet (DIRKSEN und HOFMANN, 1974).

FANKHAUSER et al. (1981) berichteten über die Toxizität von Nitrofuranen bei Saugkälbern nach Applikation von 30 mg/kg KGW/Tag. Die Tiere zeigten Muskeltremor, krummen Rücken, Kreisbewegung und tonisch-klonische Krämpfe, auslösbar durch Berührung und akustische Reize. Zwei Tiere starben. Durch Überdosierung von Furazolidon bei Kälbern wurden von STÖBER (1970) nach kurzer Zeit ebenfalls Krankheitssymptome, wie gesteigerte Sensibilität, Tremor der Hautmuskulatur, Koliken, steppender Gang und Paralyse der Nachhand, beobachtet.

Die chronische Furazolidonvergiftung der Saugkälber wurde als Folge anhaltender Applikation von Furazolidon in geringer Dosierung im Milchaustauscher angesehen. Die sogenannten hämorrhagischen Diathesen traten im Zusammenhang mit Leukopenie, Erythrozytopenie und Thrombozytopenie auf (HOFMANN, 1972; GLAWISCHNIG und BÄRMGARTNER, 1973; HOFMANN et al., 1974; HOFMANN et al., 1977; POHLENZ et al., 1976). Die Veränderungen des Knochenmarks bei chronischer Furazolidonvergiftung von Kälbern wurden von HOFFMANN-FEZER et al. (1974) untersucht. Sowohl die Megakaryozyten als auch die Thrombozyten und die Zellen der Granulo- und Erythropoese waren mit geringer zeitlicher Differenz zunächst vermindert und erreichten anschließend wieder Normalwerte. 1 bis 2 Wochen vor dem Tod der Tiere wurde eine starke Verringerung aller Zellelemente des Knochenmarks festgestellt, als deren Ursache eine toxische Wirkung des Furazolidons auf das Knochenmarksparenchym, eine Mitosehemmung und eine periphere Eliminierung mit Regeneration und darauffolgender Erschöpfung des Markparenchyms diskutiert werden.

GYLSTORFF (1978) berichtete über die akute, subakute und chronische Toxizität bei verschiedenen Labortieren. Chronische Toxizitätsteste bei Hunden gaben keinen Hinweis auf Cancerogenität oder Onkogenität von Furazolidon. Auch an der F₁, F₂ und F₃ -Generation von Ratten, die 0,30 und 100 g Furazolidon/t Futter erhielten,

wurden keine Abnormitäten beobachtet. Für die Karzinombildung bei Ratten schienen sowohl der Thiazolring wie die Nitrogruppe am Furanring notwendig zu sein. Der Autor führte weiterhin den Hemmeffekt des Furazolidons auf die Gewebeatmung vor allem durch Hemmung der Acetylierung von Coenzym A in einem System, das Pyruvat, Diphosphopyridinnucleotid und Coenzym enthielt, zurück.

Eine antitumoröse Wirkung mancher Nitrofurane gegenüber "Ehrlich Ascites-Karzinomzellen", Lungenmetastasen und Hodentumoren wurde von einigen Autoren festgestellt, wobei als Grund eine Suppression der Dehydrogenase-Tätigkeit bzw. der Synthese von RNS, DNS oder des Proteins in Tumorzellen verantwortlich gemacht wurde. Die antitumoröse Wirkung wurde neuerdings auch auf die hypoxische Eigenschaft dieser Tumoren und der dadurch resultierenden günstigeren hohen Aktivität der Nitroreduktasen zurückgeführt (MIURA und RECKENDORF, 1967; OLIVE, 1978; OMER, 1978). Jedoch berichteten zahlreiche Autoren über carcinogene und mutagene Eigenschaften der Nitrofurane (COHEN et al., 1973; TATSUMI et al., 1977; KLEMENCIC und WANG, 1978; COHEN, 1978).

Einige Arbeitsgruppen berichteten über die Fähigkeit mancher Nitrofurane die Bakterien- und Körperzellen-DNS zu schädigen, die Protein-, RNS- und DNS-Synthese zu hemmen und die Entwicklung von Prophagen zu induzieren (TATSUMI et al. 1977; KLEMENCIC und WANG, 1978).

COHEN et al. (1973) untersuchten u.a. die Carcinogenität strukturverwandter Nitrofurane an Mäusen. Viele dieser Verbindungen erzeugten bei den Versuchstieren

im nicht drüsenbesetzten Teil des Magens Carcinome, wobei auch Gewebe befallen wurden, die den Magen umgaben, wie z.B. Milz, Leber, Pancreas, Lymphknoten, Mesenterium, Eingeweide. Andere Verbindungen führten zu Harnblasen-Carcinomen, Brustdrüsenadenocarcinomen, lymphatischer Leukose oder Alveolarzellcarcinomen in der Lunge.

Wegen seines hohen Einsatzes in der Veterinärmedizin wurde Furazolidon umfassend auf Carcinogenität untersucht. Mammatumoren bei weiblichen, Hodenmesotheliome und Basalzellepitheliome bei männlichen Ratten wurden meist gefunden, wenn den Versuchstieren Furazolidon bis zu 1000 mg/kg verabreicht wurde. Schild- und Talgdrüsenadenome traten bei beiden Geschlechtern der Fischer-Ratten auf. Abhängig von der Dosis und unabhängig vom Geschlecht induzierte Furazolidon bei Mäusen die Bildung von Bronchialcarcinomen. Die Notwendigkeit der Untersuchung von mehr als einer Tierart und einem Geschlecht und die Langzeitverabreichung des Medikaments wurden daraufhin von den Autoren besonders hervorgehoben (COHEN, 1978).

3. RÜCKSTANDSANALYTIK

Die Bestimmungsmöglichkeiten für Nitrofurane lassen sich in mikrobiologische und chemische bzw. mikrochemische Verfahren einteilen. Da die Entwicklung der Mikrochemie in der Lebensmittelanalytik, qualitativ wie quantitativ, empfindlichere Nachweisgrenzen erlaubt, nimmt die Darstellung dieser Verfahren einen breiteren Raum ein als die Vorstellung der nicht so bedeutsamen mikrobiologischen Nachweismethoden.

3.1 M i k r o b i o l o g i s c h e M e t h o d e n

Nach § 20 Abs. 4 Anlage 4 der Ausführungsbestimmungen A über die Untersuchung und gesundheitspolizeiliche Behandlung der Schlachttiere und des Fleisches bei Schlachtieren im Inland (i.d.F. vom 3.2.1978, BGBl.I S.201) ist der Hemmstofftest als offizielle Methode zum Nachweis von Antibiotika bei Not- und Krankschlachtungen und stichprobenweise bei Normalschlachtungen vorgeschrieben.

Der Hemmstofftest ist ein mikrobiologisches Nachweisverfahren, das auf der Eigenschaft der Antibiotika beruht, bakterielles Wachstum zu hemmen. Unter Berücksichtigung der dafür zugrundeliegenden Technik wurden für verschiedene Zwecke Verfahren entwickelt, deren Methodik vom Bundesgesundheitsamt in Berlin bekanntgegeben wird.

Zum qualitativen und quantitativen Nachweis von antibakteriell wirksamen Substanzen in Muskel und Organproben dient z.B. der Plattendiffusionstest. Bei diesem Verfahren werden in den mit Testkeimen beimpften Nährboden Löcher gestanzt, in die eine definierte Menge der zu untersuchenden Probe eingebracht wird.

Nach einer bestimmten Bebrütungszeit wird das Keimwachstum in Form von Kolonien sichtbar und im positiven Fall entstehen Hemmhöfe, die ausgemessen werden können und dem Logarithmus der Antibiotikakonzentration proportional sind. Der Nachteil dieses Testes ist es, daß er nicht für alle Antibiotika gleich empfindlich ist. Die Trennung der einzelnen Antibiotika kann aber mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese erreicht werden.

Eine mikrobiologische Methode zum Nachweis von Furazolidon-Rückständen in Fleisch und Eiern ist noch nicht beschrieben. Hemmstoffkonzentrationen von Furazolidon im phosphatgepufferten Milieu (pH 6,0) sind jedoch bis zu 0,2 mg/kg mikrobiologisch nachweisbar (LÜDERS und HINZ, 1978).

MATZKE und GEDEK (1975) konnten nach oraler Verabreichung eines Chloramphenicol/Furazolidon-Kombinationspräparates an Kälbern nach einer nur 24-stündigen Wartezeit keine positiven Befunde in Niere und Muskel ermitteln. 2,4 mg Furazolidon/kg KGW wurden oral verabreicht. Die Hemmstoffuntersuchung erfolgte nach der vom Bundesgesundheitsamt bekanntgegebenen Methodik.

GANG und SHAIKH (1972) benutzten zum Nachweis von Furazolidon und Nitrofurantoin im Serum und im Harn eine mikrobiologische Methode, die darauf abzielt, im Reagenzglas eine Trübung zu erzeugen, die mittels eines Farbmessers abgelesen wird. *Streptococcus faecalis* diente als organischer Indikator. Befriedigende Ergebnisse wurden erreicht, wenn die Konzentration des Hemmstoffes zwischen 0,4 und 2,4 mg/l für Nitrofurantoin bzw. zwischen 0,2 und 1,2 mg/l für Furazolidon lag.

Über Nifurprazin lagen nur wenige Daten vor. Im mikrobiologischen Nachweisverfahren wurde die untere Nachweisgrenze im Eiklar mit 0,04 mg/kg, im Eigelb mit 0,3 mg/kg und 2,5 mg/kg angegeben (LÜDERS und HINZ, 1978).

GEDEK et al. (1976) benutzten für den mikrobiologischen Nachweis von Nifurprazin in Körperflüssigkeiten und -geweben vom Rind *Bac. subtilis* (BGA) auf Difco-Antibiotic-Medium 1 (Agar-pH 7,4). Die Erfassungsgrenze lag im Blutserum, in der Milch und in der Galle bei 0,03 mg/l, im Muskel und in der Niere bei 0,15 mg/kg, in der Leber bei 0,3 mg/kg.

Zum Nachweis von Nifurprazin im Harn diente ebenfalls das Agardiffusionsverfahren. Zur Beseitigung der unspezifischen Hemmwirkungen war jedoch eine Änderung der Versuchsanordnung notwendig. Die Nachweisgrenze für Nifurprazin im Harn lag bei 0,125 mg/l (GEDEK et al., 1976).

HENNINGSON (1961) benutzte zum Nachweis von Furacin (Nitrofurazon) nach intramammärer Applikation ebenfalls *Bac. subtilis* auf Penn-Assay-Agar unter Verwendung der "disc-assay-method", wobei die unterste Nachweisgrenze mit 0,03 mg/l Milch festgelegt werden konnte.

MAURER (1978) untersuchte die Hemmstoffausscheidung in Blut, Milch und Harn nach intrauteriner Applikation verschiedener Nitrofuranabkömmlinge. Als Nachweismethode diente das Agardiffusionsverfahren in Form des Lochtestes. Die Nachweisgrenze lag für Furacin bei 7,8 mg/l in der Milch, 3,9 mg/l im Blutserum und bei 3,9 mg/l im Harn.

Nach einer Applikation von sechs Uterusstäben (1,5 g Wirkstoff) konnte er in der Milch, im Serum und im Harn keine meßbaren Furacin-Konzentrationen nachweisen.

HENNINGSON et al. (1963) konnten ebenfalls weder nach intrauteriner Infusion einer wäßrigen Furacin-Lösung noch nach Applikation von Furacin-Suppositorien, eine Hemmstoffausscheidung in der Milch feststellen.

3.2 Chemische Methoden

3.2.1 Kolorimetrie, Photometrie

Aufgrund der starken Färbung der Nitrofurane kommt der Farbmessung als einfachste Bestimmungsmethode Bedeutung zu. Untersuchungsergebnisse des direkten spektro- bzw. photometrischen Verhaltens von Nitrofurantoin, Furacin und Furazolidon waren zufriedenstellend (MIURA und RECKENDORF, 1967).

Jedoch schon in jüngster Zeit wurde als weitere, spezifischere Reaktion größerer Farbempfindlichkeit als die direkte Messung von einigen Autoren die Formation und photometrische Messung des 5-Nitro-2-furfuraldehyd-Phenylhydrazons vorgeschlagen. Dieses photometrische Verfahren kam sowohl bei der Bestimmung von Nitrofuranen in pharmazeutischen Präparaten als auch in den verschiedenen Körperflüssigkeiten und Geweben zur Anwendung. Es wurde erstmal 1956 von BUZARD et al. beschrieben und beruht auf einer Hydrazonbildung durch Erhitzen der Nitrofuran-Derivate mit Phenylhydrazin in Salzsäure 5 mol/l gegen Blindversuch mit Reduktion der Nitrogruppe mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ und Messung des Hydrazons nach Ausschütteln mit Toluol bei 430 nm. Bei dieser Methode wurden nicht selektiv das Nitrofuran sondern auch seine Metaboliten und Abbauprodukte miterfaßt, während mit der mikrobiologischen Bestimmung nur das noch antibakteriell wirksame Antibiotikum nachgewiesen wurde.

BUZARD et al. (1956) ermittelten bei diesem spektrophotometrischen Nachweis von Furazolidon in vitro aus Ratten-Plasma oder -Serum eine Wiederauffindung von 90-97%, und machten gleichzeitig auf die unvollständige Umwandlung des Nitrofurans in Phenylhydrazon aufmerksam. Die Nachweisempfindlichkeit lag bei 1 mg/l Plasma für Nitrofurazon und Nitrofurantoin und wenig darunter für Furazolidon.

Mit dieser Methode führten BUZARD et al. (1961) eine detaillierte Untersuchung über die Resorption, Verteilung und Ausscheidung von Nitrofurantoin bei Ratten durch.

Dieses Verfahren von BUZARD wurde im Laufe der Zeit mehrmals modifiziert, blieb jedoch lange die Methode der Wahl zum Nachweis von Nitrofuranen. PAUL et al. (1960) benutzten sie zum Studium der Pharmakokinetik verschiedener Nitrofurane. Bis zu 0,8 mg/kg eines Nitrofurans konnten die Autoren im Kälbermuskel nachweisen.

Die Nitrofuran-Bestimmung in stark pigmentierten Geweben wie Leber ist mit dieser Methode wegen kolorimetrischer Interferenz problematisch. HERRETT und BUZARD (1960) modifizierten daraufhin das Verfahren und chromatographierten die nach dem Zentrifugieren gewonnene Toluollösung auf einer Al_2O_3 -Säule zur Entfernung störender Stoffe. Furazolidon- und Nitrofurazon-Gehalte von 0,5 mg/kg in Hühner-Leber wurden bei Ausbeuten von über 92% sicher erfasst.

KRIEG (1972) sowie KRIEG und LÖLIGER (1973) benutzten diese beiden beschriebenen Methoden zur Analyse des Übergangs von Furazolidon in das Ei und zum Nachweis dieses Nitrofurans in Blut und Geweben bei Masthühnern und Legehennen nach therapeutischer Anwendung.

MÜLLING et al. (1971) sowie PIETSCH et al. (1978) verwendeten die BUZARD-Methode zur Untersuchung der Resorption, Verträglichkeit und Plasmakonzentrationen von Furazolidon bei Kälbern. Die Nachweisgrenze lag bei etwa 1 mg/l Plasma. NEGELE (1974) untersuchte mit der gleichen Methode die Furazolidonanreicherung im Forelenserum. Eine minimale Furazolidonkonzentration von 0,3 mg/l Serum, 24 Stunden p. appl., wurde angegeben.

PAAR (1962) machte erstmals Gebrauch von der direkten photometrischen Messung von Nitrofurazon in der Milch. Nach Ausfällung der Milchproteine mit Natriumwolframat und Schwefelsäure erfolgte die Messung bei 375 nm. Die Nachweisempfindlichkeit war 0,5 mg/l.

COX und HEOTIS (1962) verwendeten die indirekte Methode, wie von HERRETT und BUZARD (1960) beschrieben, zum Nitrofurazonnachweis in der Milch (zitiert nach STONE, 1964). Eine Nachweisgrenze von 0,25 mg/l wurde angegeben.

Durch Erhöhung der Einwaage auf 120 ml Milch und NaCl-Zugabe zur Emulsionsvorbeuge verbesserte STONE (1964) die Nachweisgrenze (0,01 mg/l) der indirekten photometrischen Methode.

Angaben bezüglich der photometrischen Furazolidonanalytik im Urin wurden in der Literatur nur bei wenigen Autoren gefunden. HOLLIFIELD und CONKLIN (1968) sowie CRAINE und RAY (1972) benutzten die BUZARD-Methode, um einen zusätzlichen Beweis über die Identifikation eines auf Papierchromatographie bzw. Ionenaustauschchromatographie entdeckten, isolierten und über die Umwandlung in Phenylhydrazon nachgewiesenen Furazolidonmetaboliten im menschlichen- und Hunde-Urin zu bringen.

Da Nitrofurantoin vorwiegend in der Humanmedizin zur Behandlung von Harnwegsinfekten verwendet wird, bediente man sich des kolorimetrischen Bestimmungsverfahrens, um Aufschluß über seine Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit zu erhalten. Hierbei wurde entweder die auf CONKLIN und HOLLIFIELD (1965) zurückgehende Methode der Farbsalzbildung mit Hyamin, oder die Phenylhydrazin-Methode nach BUZARD et al. (1956) angewendet (EBEL et al., 1979).

3.2.2 Gaschromatographie

Schon früh wurde die Gaschromatographie mit Erfolg in der Rückstandsanalytik eingesetzt. Sie blieb jedoch der Nitrofuranbestimmung in biologischem Material nicht ganz zugänglich.

Zunächst gelang die gaschromatographische Bestimmung von Nitrofuranen und seinen Derivaten unter Verwendung des Flammenionisationsdetektors (FID) (FRAHM et al., 1975).

Auch in Verbindung mit dem viel vorteilhafteren Elektroneneinfangdetektor (ECD) blieb die Gaschromatographie für den Nachweis von Nitrofuranen kaum benützt. Wir fanden sie bei drei Autorengruppen, die unabhängig voneinander ein Analyseverfahren zur Nitrofuran-Rückstandsbestimmung in verschiedenen tierischen Materialien erarbeiteten. Sie benutzten alle die Gas-flüssig-Chromatographie in Verbindung mit Elektroneneinfangdetektor. Gemeinsam ist allen, wenn auch auf unterschiedlichem Wege, die Umwandlung des Nitrofurans in 5-Nitro-2-furfuraldehyd-Phenylhydrazon, wie es von HERRETT und BUZARD (1960) beschrieben wurde. RITCHIE et al. (1977) veränderten diesen Schritt nur geringfügig.

Nach Hydrolyse und Extraktion wurde die 5-Nitro-2-furfuraldehyd-Verbindung (5N2F) gas-flüssig-chromatographisch bestimmt.

RYAN et al. (1975) gaben die Nachweisgrenze mit etwa 10 µg/kg für Muskel bzw. pro liter für Milch, 100 µg/kg für Leber und 50 µg/kg für Fett an. Sie untersuchten Furazolidon in Geflügel- und Schweine-Geweben.

FRAHM et al. (1975) untersuchten Muskel- und andere Organproben von Puten gaschromatographisch auf Nifursol. Als untere Nachweisgrenze wurde 10 µg/kg ermittelt.

Die Empfindlichkeit der Methode nach RITCHIE et al. (1977) lag bei 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Furaltadon, Furazolidon, Nihydrazon und Nitrofurazon wurden in verschiedenen Geflügelorganen untersucht.

Mit einer Nachweisgrenze von ca. 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ lag die gaschromatographische Nitrofuranbestimmung in tierischen Geweben noch deutlich unter den Möglichkeiten eines mikrobiologischen Testes, genügte aber nicht den vom Bundesgesundheitsamt gestellten Anforderungen. Die Notwendigkeit aufwendiger Reinigungsschritte, das Fehlen der Spezifität für ein bestimmtes Nitrofuran - alle Nitrofuran-Derivate geben dasselbe Dinitrophenylhydrazon - und die niedrigen Wiederfindungsraten für Furazolidon und Furaltadon sind erhebliche Nachteile dieser Analyse. Deshalb wurden in jüngster Zeit empfindlichere chemische Nachweisverfahren gefordert (RITCHIE et al., 1977).

3.2.3 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die Flüssigkeitschromatographie wurde 1906 entdeckt und seit 1931 bei chemischen Analysen häufig angewendet, erreichte vor ca. zehn Jahren die Leistungsfähigkeit, die bis dahin der Gaschromatographie vorbehalten war. Der technische Fortschritt auf diesem Gebiet machte es möglich: Die Entwicklung von Hochdruckpumpen mit Impulsbeschränkung, von Säulen und Injektionssystemen, die dem Hochdruck angepaßt sind und von leistungsstarken Detektionssystemen führte zu einem völlig neuen und leistungsstarken Trennverfahren, der Hochdruckflüssigkeitschromatographie. HPLC ist die Abkürzung für High Pressure (bzw. Performance) Liquid Chromatography.

Für die Flüssigchromatographie ist Bedingung, daß sich die Probe in irgendeinem Lösungsmittel löst. Außer bei

vernetzten hochmolekularen Stoffen trifft dies für die meisten Arzneimittel zu. Dagegen lassen sich nur etwa 20% der bekannten organischen Verbindungen ohne Vorbehandlung gaschromatographisch analysieren. Außerdem macht die hohe Trennkraft der HPLC diese Technik besonders geeignet zur Darstellung eng verwandter Verbindungen und damit zur Erforschung von Metabolisierungsvorgängen.

Zur Trennung eines Substanzgemisches ist nur die unterschiedliche Adsorptions- und Verteilungschromatographie der verschiedenen Molekülsorten im Gemisch an polaren und unpolaren Phasen geeignet, wobei die Trennung sehr schnell, scharf und unter Druck erfolgt. Eine Pumpe drückt pulsationsfrei die mobile Phase aus einem Vorratsgefäß in die Säule, wovon sich die Injektionsstelle der Probe befindet.

Das System basiert auf der Polarität der mobilen Phase gegenüber der Polarität der stationären Phase. Als Elutionsmittel an polaren stationären Phasen (wie Kieselgel) kommen nur unpolare, mit Wasser nicht mischbare Lösungsmittel in Frage. Ein solches System nennt man "straight phase system".

Von "reversed phase system" - Chromatographie mit Phasenumkehr - spricht man immer dann, wenn die Elution an unpolaren stationären Phasen, die durch Umsetzung der Silanol-Gruppen des Kieselgels mit Alkylgruppen hergestellt werden, mit polaren Lösungsmitteln erfolgt. Diese unpolare Trennphase eignet sich zum Trennen fast aller organischer Substanzen - mit Ausnahme ganz unpolarer Moleküle - und der allermeisten Naturstoffe bei Verwendung von Wasser-Methanol-Mischungen als Elutionsmittel.

Wasser kann die apolaren, hydrophoben Alkylgruppen der stationären Phase nicht benetzen und in keinerlei Wechselbeziehung zu ihnen treten. Im allgemeinen verringert es die Retentionszeit, ebenso wie Methanol oder Acetonitril. Je größer aber der Wasseranteil des Eluenten ist, desto länger sind die Retentionszeiten, weil die Proben-

substanzen von der reversed-phase-Oberfläche umso stärker festgehalten werden. Eine optimale Einstellung der Retentionszeit läßt sich daher durch Änderung des Anteils am organischen Lösungsmittel erreichen. Als Maß für die Tendenz eines Stoffes, sich bevorzugt in der einen oder anderen Phase aufzuhalten, dient der Verteilungskoeffizient K . Damit sich ein Stoffgemisch trennt, müssen die verschiedenen Komponenten im chromatographischen System verschiedene Verteilungskoeffizienten haben.

Für die Trennung von Nitrofuranen wurde hauptsächlich die Verwendung von Reversed-phase Chromatographie beschrieben, wobei RP-8-Säulen häufiger zur Anwendung kamen (ERNST und VAN DER KAADEN, 1980; SUGDEN et al., 1983). Die Säulenfüllmaterialien werden auf der Basis von chemisch modifiziertem Kieselgel hergestellt. Die Struktur der chromatographisch aktiven Schicht stellen Octadecylgruppen dar, die chemisch über Si-C-Bildungen zu Kieselgel gebunden sind. Mit diesen Trägern sind Verteilungen zwischen einer unpolaren stationären Phase und einer polaren mobilen Phase an der lipophilen Trägoberfläche möglich. Der zugrundeliegende Trennmechanismus ist die Anziehung zwischen den Kohlenwasserstoffen der Probenmoleküle und den Octadecylgruppen des Trägermaterials durch van der Waal'sche Kräfte. Je mehr die Probenmoleküle Kohlenwasserstoffen ähneln, desto stärker werden sie angezogen. Dieser Unterschied in der chemischen Struktur der Moleküle ist es, der zu einer stärkeren oder schwächeren Adsorption an der stationären Phase und damit zu einer Trennung führt.

Große Bedeutung für die Trennleistung besitzt die Korngröße des Säulenfüllmaterials. Nur mit kleinen Teilchendurchmessern erzielt man gute Trennleistungen und kurze Analysenzeiten. Zu analytischen Trennungen sind heute Packungsmaterialien mit einer Partikelgröße von 3-10 μm üblich (MACHEREY-NAGEL, 1982).

Am Ende der Trennsäule befindet sich ein Detektor, dessen Aufgabe es in einem chromatographischen System ist, durch Messung physikalischer Größen die Zusammensetzung des Eluenten kontinuierlich zu überwachen, d.h. jede Änderung der Zusammensetzung der mobilen Phase festzustellen, dies in ein elektrisches Signal umzuwandeln und das Signal dem Schreiber weiterzuleiten. Der Schreiber zeichnet dieses dann als Abweichung von der Nulllinie in Form von Gaußkurven, die als Signale oder Peaks bezeichnet werden.

UV-Detektoren sind zur Zeit immer noch die am häufigsten benutzten Detektoren in der HPLC. Ein UV-Detektor erfährt nur Stoffe, die bei der gewählten Wellenlänge eine gewisse Mindestabsorption von UV-Licht zeigen, er ist also selektiv (MEYER, 1980).

Das HPLC-Chromatogramm liefert unmittelbar eine qualitative und quantitative Aussage. Die Elutionszeit ist für jeden Stoff eines Gemisches charakteristisch und die Fläche jedes Signals ist der Menge des entsprechenden Stoffes proportional. Die Retentionszeit einer Substanz ist die Zeit von der Injektion der Probe in die Säule bis zum Erscheinen des Signalmaximums im Chromatogramm. Zur Identifikation eines Peaks injiziert man die in Frage kommende Reinsubstanz und vergleicht die Retentionszeit der Reinsubstanz mit der der Probe. Hat ein Vergleichsstoff die gleiche Retentionszeit wie ein Peak im Chromatogramm, so könnten beide Substanzen identisch sein. Zur Absicherung kann man den Vergleichsstoff mit einem Teil der Probe mischen und miteinander injizieren. Der fragliche Peak soll höher werden, ohne irgendwelche Schultern oder Verbreiterungen zu zeigen, d.h. keine Andeutung einer Trennung aufweisen. Verändert man beim UV-Detektor die Wellenlänge, so sollen sich die Signale von Probe und Referenz in gleicher Weise verändern, also um den gleichen Anteil größer oder kleiner werden. Zur quantitativen Analyse injiziert man eine Lösung mit

genau bekannter Konzentration des zu bestimmenden Stoffes (externer Standard), bestimmt die Fläche unter dem zugehörigen Peak und ermittelt damit die Konzentration des Stoffes in der Probe. Ein Vergleich der Peakhöhen genügt für eine gute Annäherung. Zur qualitativen Absicherung kann man als internen Standard der Probe und der Eichlösung noch eine weitere Komponente zufügen (MEYER, 1980).

3.2.4 Papier-, Dünnschicht- und Ionenaustauschchromatographie

Die in diesem Kapitel angeführten Nachweismethoden spielen nach heutigem Stand der Spurenanalytik keine besondere Rolle oder sind in der Durchführung zu aufwendig. Sie wurden dennoch in der Literatur vereinzelt erwähnt.

a) Papierchromatographie

Bei der Papierchromatographie wird die unterschiedliche Löslichkeit der zu trennenden Substanzen im Laufmittel ausgenutzt. Als Träger der stationären Phase dient ein Spezialfilterpapier. Gemessen wird das Verhältnis der Wanderungsstrecke der Substanz zur Laufmittelfront (R_f -Wert; Relation zur Front). Die Sichtbarmachung gewanderten Furazolidons gelang am besten mit schwach ammoniakalischem, wasserhaltigen n-Butanol im Tageslicht (gelb) oder im UV-Licht (hellbraun) (BREINLICH, 1964).

HOLLIFIELD und CONKLIN (1968) benutzten dieses Verfahren zur qualitativen bzw. quantitativen Differenzierung von Furazolidon und seinen Metaboliten.

b) Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie beruht auf dem gleichen Prinzip wie die Papierchromatographie. Als stationäre Phasen werden bevorzugt Cellulosepulver oder Kieselgelplatten verwendet. Furazolidon kommt im UV-Licht als violett-grauer Fleck zum Vorschein (BREINLICH, 1964).

Die Visualisierung der Absorptionsstelle kann auch durch einen Fluoreszenzindikator erreicht werden. PETZ (1982 b) benutzte die Dünnschichtchromatographie mit Kieselgelplatten zur Absicherung von Nitrofuran-Befunden durch HPLC-Fraktionierung. Dabei wurde die entwickelte Platte mit Pyridin besprüht und mit langwelligem UV-Licht bestrahlt (PETZ, 1982 b).

Eine sehr aufwendige "programmed multiple development-thin layer chromatography" (PMD-TLC) entwickelten HEOTIS et al. (1980) zur quantitativen Bestimmung von Furazolidon in Geflügel-, Schweine- und Rinder-Geweben. Das fluoreszierende Derivat des Furazolidons wurde in der gleichen Weise wie bei PETZ (1982 b) erreicht und mit einem Fluorodensitometer, gekoppelt an einem "computing integrator", bestimmt. Nach mehreren Extraktionsschritten und Einengung des Extrakts wurde für Furazolidon als untere Nachweisgrenze 2 µg/kg angegeben, wenn 5 g Probenmenge zur Extraktion kamen.

c) Ionenaustauschchromatographie

Dieses Trennverfahren wurde nur einmal in der Literatur erwähnt. CRAINE und RAY (1972) analysierten damit die Furazolidonmetaboliten in Geflügelurin. Der Trennungsgang kam bei der Methode durch Wechselwirkung von Ionen (Furazolidon) der mobilen Phase und ionisierten Gruppen der stationären Phase zustande.

4. RÜCKSTANDSVERHALTEN VON NITROFURANEN

Die Pharmakokinetik und das Rückstandsverhalten der Nitrofurane finden heute unter dem Aspekt der möglichen Nebenwirkungen im internationalen und nationalen Schrifttum immer mehr Beachtung. Zunächst wurden die Analyseverfahren zur Kontrolle von Futtermitteln eingesetzt. Die meisten Publikationen der letzten Zeit berichteten über die erfolgreiche Anwendung der HPLC zur Bestimmung von Nitrofuranen in tierischen Körperflüssigkeiten und eßbaren tierischen Geweben.

Nitrofurane weisen ihr Absorptionsmaximum bei etwa 360 nm auf. Bei dieser Wellenlänge werden kaum Coextraktive angezeigt, mit Ausnahme verschiedener Sulfonamide und Tetracycline. In der Milch, sowie bisweilen in Eiern, können bei den von den verschiedenen Autoren empfohlenen HPLC-Bedingungen (Stör-)Peaks auftreten, die meist von den Nitrofuranen gut abgetrennt werden können. Ebenfalls in Milch und Eiern kann Riboflavin als störend auftreten. Im allgemeinen wird aber die gute Selektivität der HPLC für Nitrofurane bestätigt.

Gemäß der Bedeutung und des Verbots anderer Nitrofurane nimmt die Furazolidonbestimmung in der Literatur eine Sonderstellung ein. Nach Ansicht aller Untersucher stellt dabei die HPLC ein genaues und zuverlässiges analytisches Verfahren zum Nachweis von Nitrofuranen dar, das gut brauchbar ist für "routine monitoring" auch in der Lebensmittelchemie.

In der Tabelle 1 sind die in der Veterinärmedizin meist verabreichten Nitrofurane und ihre wichtigsten Nachweisverfahren zusammengefaßt.

Tab. 1: Zusammenfassung der wichtigsten Nachweisverfahren von Nitrofuranen

Nitro- furan- Derivat	Tier- art	Ver- fahren	Probe	Nachweis- grenze in mg/kg bzw. mg/l	Quelle
F U R A Z O L I D O N	<u>Geflügel</u>	K	Leber	1,0	HERRETT et al. (1960)
			Muskel	1,0	
			Fett	1,0	
	<u>Geflügel</u>	K	Leber	0,5	KRIEG u. LÖLIGER (1973)
			Niere	0,5	
			Muskel	0,5	
			Blut	0,5	
	<u>Geflügel</u>	GC	Muskel	0,01	RYAN et al. (1975)
			Leber	0,1	
			Fett	0,05	
	<u>Geflügel</u>	GC	Fett	0,01	RITCHIE et al. (1977)
			Niere	0,01	
			Leber	0,01	
			Muskel	0,01	
			Haut	0,01	
	<u>Pute</u>	HPLC	Muskel	0,002	HOENER et al. (1979)
			Leber	0,002	
	<u>Geflügel</u>	HPLC	Muskel	0,002	SUGDEN et al. (1983)
			Leber	0,002	
			Niere	0,002	
	<u>Pute</u>	HPLC	Muskel	0,0005	WINTERLIN et al. (1981 u.1982)
			Leber	0,0005	
			Niere	0,0005	
			Fett	0,0005	
			Haut	0,0005	
	<u>Geflügel</u>	K	Eier	0,5	KRIEG (1972)
	<u>Geflügel</u>	HPLC	Eier	0,01	PETZ (1982a u. 1984)

K = Kolorimetrie

GC = Gaschromatographie

HPLC = Hochdruckflüssigkeitschromatographie

MT = Mikrobiologisches Testverfahren

Fortsetzung Tab. 1: Zusammenfassung der wichtigsten Nachweisverfahren von Nitrofuranen

Nitro- furan- Derivat	Tier- art	Ver- fahren	Probe	Nachweis- grenze in mg/kg bzw. mg/l	Quelle
FURAZOLIDON	<u>Kalb</u>	K	Muskel	0,8	PAUL et al. (1960)
	<u>Kalb</u>	K	Blut	0,5	MÜLLING et al. (1971)
	<u>Kalb</u>	K	Blut	1,0	PIETSCH et al. (1977)
	<u>Schwein</u>	GC	Muskel Leber Fett	0,01 0,1 0,05	RYAN et al. (1975)
	<u>Schwein</u>	HPLC	Leber Niere	0,05 0,05	ERNST u. V.D. KAADEN (1980)
	<u>Schwein</u>	HPLC	Blut	0,001	VEALE u. HAR- RINGTON (1982)
	<u>Schwein</u>	HPLC	Fleisch	0,01	PETZ (1982a)
	<u>Schwein</u>	HPLC	Muskel Leber Niere	0,002 0,002 0,002	SUGDEN et al. (1983)
	<u>Rind</u>	GC	Milch	0,01	RYAN et al. (1975)
	<u>Rind</u>	HPLC	Milch	0,01	PETZ (1982a)
	<u>Rind</u>	K	Milch	0,5	PAAR (1962)
NITROFURAZON	<u>Rind</u>	K	Milch	0,01	STONE (1964)
	<u>Rind</u>	MT	Milch Blut	7,8 3,9	MAURER (1978)
	<u>Rind</u>	GC	Milch	0,01	RYAN et al. (1975)
	<u>Rind</u>	HPLC	Milch	0,005	VILIM u. MAC- INTOSH (1979)
	<u>Rind</u>	HPLC	Milch	0,01	PETZ (1982a)
	<u>Rind</u>	HPLC	Milch	0,01	PETZ (1982a)

K = Kolorimetrie

GC = Gaschromatographie

HPLC = Hochdruckflüssigkeitschromatographie

MT = Mikrobiologisches Testverfahren

Fortsetzung Tab. 1: Zusammenfassung der wichtigsten Nachweisverfahren von Nitrofuranen

Nitro- furan- Derivat	Tier- art	Ver- fahren	Probe	Nachweis- grenze in mg/kg bzw. mg/l	Quelle
N I T R O F U R A Z O N	<u>Schwein</u>	GC	Muskel	0,01	RYAN et al. (1975)
			Leber	0,1	
			Fett	0,05	
	<u>Schwein</u>	HPLC	Fleisch	0,01	PETZ (1982a)
	<u>Geflügel</u>	K	Leber	1,0	HERRETT et al. (1960)
			Muskel	1,0	
			Fett	1,0	
	<u>Geflügel</u>	GC	Muskel	0,01	RYAN et al. (1975)
			Leber	0,1	
			Fett	0,05	
N I F U R P R A Z I N	<u>Geflügel</u>	GC	Fett	0,01	RITCHIE et al. (1977)
			Niere	0,01	
			Leber	0,01	
			Muskel	0,01	
			Haut	0,01	
	<u>Rind</u>	MT	Milch	0,03	GEDEK et al. (1976)
			Blut	0,03	
			Harn	0,125	
			Galle	0,03	
			Muskel	0,15	
			Niere	0,15	
			Leber	0,3	
	<u>Geflügel</u>	MT	Eiklar	0,04	LÜDERS u. HINZ (1978)
			Eidotter	0,3	
			Muskel	0,3-2,5	
			Leber	0,3-2,5	
N I F U R S O L	<u>Pute</u>	GC	Muskel	0,01	FRAHM et al. (1975)
			Leber	0,01	
			Niere	0,01	
			Haut	0,01	

K = Kolorimetrie

GC = Gaschromatographie

HPLC = Hochdruckflüssigkeitschromatographie

MT = Mikrobiologisches Testverfahren

4.1 K ö r p e r f l ü s s i g k e i t e n

Die HPLC wurde auch zur Bestimmung von Nitrofuranen in Körperflüssigkeiten benutzt. Die meisten Publikationen behandeln die quantitative Bestimmung von Nitrofurantoin und seinen Metaboliten in menschlichen Körperflüssigkeiten, um Aufschluß über Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit des Nitrofurans zu erhalten. Zur Analytik einzelner Nitrofurane in tierischen Körperflüssigkeiten finden sich in der Literatur nur wenige Angaben.

Die Bedingungen für die HPLC-Analyse von Nitrofurantoin in Plasma und Urin variierten in den einzelnen Publikationen stark, so daß es nicht möglich ist, alle Verfahren und Ergebnisse im Detail darzulegen. Deshalb sollen nur die wichtigsten Übereinstimmungen und Unterschiede aufgezeigt werden. Alle Autoren benützten Reversed-phase-Trennsäulen (RP-18 oder RP-8). Die Wellenlänge des UV-Detektors wurde bei 365 nm (AUFRERE et al., 1977; ROSEBOOM und KOSTER, 1978) oder bei 280 und 365 nm (HOENER et al., 1979) oder bei 368 nm und elektrochemischer Detektion (EBEL et al., 1979) oder bei 370 nm und spektrophotochemischer Detektion (VREE et al., 1979) gewählt. Die Injektionsvolumina reichten von 10 μ l bis 120 μ l, die geringste detektierbare Menge wurde bei einer 1 ml Plasmaprobe mit 10 μ g/l, bei Urin mit 2 μ g/l angegeben (ROSEBOOM und KOSTER, 1978).

Nach Meinung der Autoren ist die HPLC im Hinblick auf rasche Durchführbarkeit und hohe Empfindlichkeit für routinemäßige Untersuchungen geeignet. Dabei ist es bemerkenswert, daß zur Bestimmung nur kleinste Probenmengen erforderlich sind (10 μ l) (VREE et al., 1979), was in der klinischen Chemie besonders wichtig ist. Strukturverwandte Pharmaka werden auch mit der jeweiligen Methode mit Erfolg bestimmt. So schlugen AUFRERE et al. (1977) zur Bestimmung von Furazolidon- und Nitrofurazonrückständen in Milch und homogenisiertem Leber-

gewebe, die von ihnen entwickelte Methode zum Nachweis von Nitrofurantoin in menschlichem Plasma und Urin vor.

Blut

In der Literatur erschien nur ein Bericht über Furazolidonbestimmung im Schweineplasma mit HPLC. VEALE und HARRINGTON (1982) untersuchten *in vitro* mit einer einfachen Methode das Verhalten von Furazolidon im Blut. Die Autoren stellten fest, daß sich das Furazolidon zu gleichen Teilen im Plasma und in den Erythrozyten verteilte, und die Wiederfindungsrate bei gekühltem Plasma täglich um ca. 10% abnahm. Bei Verwendung von UV-Detektion und einer Wellenlänge von 362 nm lagen die Wiederfindungsraten zwischen 91 und 95%, je nach zugegebener Furazolidonmenge. Die Nachweisgrenze war 0,5 µg/l Plasma absolut, wenn 2 ng Furazolidon pro 2 ml Plasma zur Extraktion kamen.

Urin und Galle

HPLC-Methoden zur Bestimmung von Nitrofuranen im Harn und in der Galle wurden bisher nicht veröffentlicht.

Milch

Nur zwei Arbeiten beschäftigten sich mit dem HPLC-Nachweis von Nitrofuranen in Milch.

VILIM und MACINTOSH (1979) wiesen mit HPLC, unter Verwendung einer Reversed-phase-Trennsäule (RP-18) bei UV-Detektion und einer Wellenlänge von 365 nm, Nitrofurazonrückstände in Milch nach. Die Erfassungsgrenze war bei 2 ml-Proben 5 µg/l absolut, die Wiederfindungsrate lag zwischen 57% und 67%. Nach Applikation von 200 mg Nitrofurazon in einem Euterviertel waren nach sechs Melkvorläufen innerhalb 72 Stunden weniger als 5 µg/l des Nitrofurans nachweisbar. Die beschriebene Methode kann auch mit wenigen Veränderungen der Furazolidon- und Furaltadonbestimmung in Milch angepaßt werden.

PETZ (1982 a) beschrieb ein HPLC-Verfahren, mit dem u.a. Furazolidon in Eiern, Fleisch und Milch nachgewiesen werden konnte. Die Extraktion erfolgte mit Acetonitril, der Abdampfrückstand wurde mit n-Hexan ausgeschüttelt. Die Analyse wurde mit Umkehrphasenchromatographie (RP-8) und UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 360 nm durchgeführt. Nitrofurangehalte bis hinunter zu 0,01 mg/kg wurden mit Ausbeuten um 80 bis 85% zuverlässig und mit guter Wiederholbarkeit bestimmt.

4.2 F l e i s c h u n d O r g a n e

Im Hinblick auf Einfachheit und Fähigkeit Nitrofurane ohne Derivatisierung oder andere chemische Modifikationen zu bestimmen, kommt die HPLC auch zur Überprüfung des Vorhandenseins von Furazolidon in Fleisch und Geweben in Betracht. Organe verschiedener Tierarten wurden untersucht.

HOENER et al. (1979), ERNST und VAN DER KAADEN (1980), WINTERLIN et al. (1981), PETZ (1982 a und 1983 a), SUGDEN et al. (1983) erreichten durch Modifikation bei der Extraktion und Reinigung eine Anwendbarkeit der HPLC zur Analyse von Nitrofuranen in den verschiedenen tierischen Organen. Die entwickelten Verfahren zeichneten sich durch gute Wiederfindungsraten, niedrige Nachweisgrenzen und geringen Aufwand an Arbeit, Zeit und Geräten aus.

HOENER et al. (1979) erarbeiteten eine Methode zum Nachweis von Furazolidon in Muskel- und Geflügel-Geweben ohne Extraktion oder Reinigung der Proben. Sie benutzten Nitrofurantoin zur qualitativen Absicherung als internen Standard und beobachteten keine Interferenzen, weder mit Nitrofurantoin und seinen Metaboliten noch mit Furazolidonmetaboliten. Bei Verwendung von Reversed-phase-Trenn-

säulen, UV-Detektor und einer Wellenlänge von 365 nm lag die Nachweisgrenze bei 2 µg/kg. Häufige Spülungen der Säule und Verwendung einer Vorsäule wurden empfohlen.

Ein ebenso einfaches HPLC-Verfahren zur Bestimmung von Furazolidonrückständen in Schweine-Leber und -Niere beschrieben ERNST et al. (1980). Die erforderlichen 50 g Probenmengen wurden mit 200 ml Äthylacetat extrahiert. Ein Reinigungsschritt ist nur bei mehr als 2% Fett in der Probe vorgesehen. Auch hier wurde mit RP-8-Säule und UV-Detektion bei 360 nm gearbeitet. Bei einem Einspritzvolumen von 20 µl lag die Erfassungsgrenze bei 0,05 mg/kg.

WINTERLIN et al. (1981) beschäftigten sich hauptsächlich mit der Rückstandsanalyse von Furazolidon in Putengeweben, einschließlich Fett und Haut. Die Extraktion wurde mit Dichlormethan (DCM) und wenn erforderlich wurde eine Reinigung der Probe mit Hexan und Essigsäure vorgenommen. Die mobile Phase bestand aus einem Methanol-Essigsäure-Gemisch, eingestellt auf pH 5,0. Die Analyse wurde mit Umkehrphasenchromatographie und einer Wellenlänge von 365 nm durchgeführt. Der Detektor zeichnete sich durch hohe Empfindlichkeit aus. Bei 2 g Einwaage war das Detektionslimit für Furazolidon in Puten-Muskel, -Leber, -Niere, -Fett und -Haut 0,5 µg/kg, wenn der Rückstand in 1 ml Essigsäure gelöst wurde. Die Wiederfindungsrate betrug im Durchschnitt 84% mit einem Variationskoeffizient von 8,6%. Ein gelegentlich auftretender Peak neben dem Furazolidon-Peak wurde möglicherweise auf die Silifikation der Gläser zurückgeführt.

PETZ (1983 a) erweiterte seine hochdruckflüssigkeitschromatographische Rückstandsanalyse auf Chloramphenicol und verschiedene Sulfonamide und Nitrofurane. Eier, Fleisch und Milch wurden untersucht. Die Methode ist dennoch einfach und zeitsparend. Die Extraktion von 25 g Einwaage erfolgte mit Acetonitril, der Abdampfrückstand wurde mit

n-Hexan ausgeschüttelt. 10 μ l des Extraktes wurden durch isokratische HPLC an RP-8-Phase analysiert. Chloramphenicol und Sulfonamide wurden bei 275 nm, Nitrofurane bei 360 nm detektiert. Die Nachweisgrenzen der im selben Arbeitsgang erfaßbaren Substanzen wurden mit 0,02 mg/kg und 0,1 mg/kg für Chloramphenicol bzw. Sulfonamide und mit 0,01 mg/kg für Nitrofurane angegeben (PETZ, 1983 a).

SUGDEN et al. (1983) beschrieben ein einfaches HPLC-Verfahren, mit dem Furazolidon- und Nitrofurazonrückstände in Geflügel- und Schweine-Geweben nachgewiesen werden konnten und überprüften anschließend die Methode in einem Tierversuch. Umkehrphasenchromatographie und UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 365 nm wurden ebenfalls benutzt. Die Untersucher extrahierten jeweils 10 g einer Probe mit einem Methanol-Wasser-Gemisch. Die Wiederfindungsrate betrug 65% für Nitrofurazon und 73% für Furazolidon, die Nachweisgrenze war 2 μ g/kg.

Acht Stunden nach oraler Verabreichung von 50 mg Furazolidon an Hennen konnten keine Rückstände in der Leber, und 24 Stunden danach keine Rückstände im Muskel festgestellt werden. Bei gleicher Dosis lagen die Werte für Nitrofurazon deutlich höher. Andere Untersucher kamen zu vergleichbaren Ergebnissen (KRIEG und LÖLIGER, 1973; RITCHIE et al., 1977).

III. E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N

1. P R O B L E M S T E L L U N G

Gegenstand der eigenen Untersuchungen ist die Verfeinerung eines HPLC-Verfahrens zum Nachweis von Furazolidon in Blut, Harn, Muskulatur, Leber und Niere von Schweinen und Kälbern. Die HPLC-Analyse soll durch in vitro-Versuche verbessert und anschließend in Tierversuchen überprüft werden.

Die Ergebnisse sollen Aufschluß geben über

- a) die Rückstandsbildung von Furazolidon in verschiedenen Geweben von schlachtbaren Nutztieren und
- b) über die Bedeutung von Blut- und/oder Harnuntersuchungen v o r der Schlachtung, um die vom Gesetzgeber festgesetzten langen Wartezeiten für Furazolidon-Präparate überprüfen zu können.

2. M A T E R I A L

2.1 F u r a z o l i d o n - P r ä p a r a t e

Zur Herstellung von Standardlösungen und zur künstlichen Kontamination von Proben in Vorversuchen wurde Furazolidon-Testsubstanz (Sigma-Chemie Nr., F9505) verwendet.

Zur oralen Verabreichung an Schweine und Kälber wurde das Furazolidon-Monopräparat FURAZOLIDON (WDT, Hannover) mit einem Wirkstoffgehalt von 100% verwendet.

2.2 V e r s u c h s t i e r e u n d
 V e r s u c h s t i e r f ü t t e r u n g

Die Staatliche Versuchsgüterverwaltung Grub bei München stellte 20 Schweine und neun Mastkälber zur Verfügung. Die kastrierten männlichen und die weiblichen Mastschweine der Deutschen Landrasse mit einem Körpergewicht von 80 bis 90 kg wurden in drei Gruppen à neun, sechs und fünf Tiere in Boxen gehalten. Die Gruppenfütterung erfolgte zweimal täglich, jeweils morgens und mittags.

Die weiblichen Mastkälber der Rasse Deutsches Fleckvieh mit einem Körpergewicht zwischen 120 und 130 kg wurden zweimal am Tag einzeln gefüttert.

2.3 P r o b e n e n t n a h m e u n d
 - a u f b e w a h r u n g

Die Proben wurden in folgender Menge entnommen:

Material	Entnahme	Menge
Blut	Vena cava cranialis Vena jugularis	10 ml
Harn	Spontanharn bzw. direkt aus der Harnblase	10 ml
Muskulatur	Zwerchfellpfeiler	50 g
Leber	Lappenrand	50 g
Niere	Nierenspitze	50 g

Zur Gerinnungshemmung des Blutes diente Ammoniumheparinat in Monovetten. Das Untersuchungsmaterial wurde nach der Probenahme entweder sofort analysiert oder unter

Lichtschutz verpackt bis zur Probenaufarbeitung bei unter -20°C tiefgefroren aufbewahrt. Für zusätzliche Kontrolluntersuchungen und Ausbeutebestimmungen standen Proben von Tieren aus verschiedenen bayerischen Schlachthöfen zur Verfügung.

3. METHODIK

3.1 H P L C - A p p a r a t u r

- A. Eine Hochdruckflüssigkeitspumpe, Modell Constametric III G, mit zwei entgegengesetzt wirkenden Saphirkolben zur pulsfreien Flußerzeugung (Milton Roy)
- B. Probenaufgäbeventil Nr. 7125 (Rheodyne)
- C. Vorsäule: 6 cm x 4,6 mm i.D. mit Perisorb RP-18, Korngröße 30-40 μm (Merck Nr. 10437)
- D. Trennsäule: 25 cm x 4,6 mm i.D., Fertigsäule mit Spherisorb ODS, Korngröße 5 μm (Laboratory Data Control) (Nr. 920161078)
- E. UV-Detektor mit variabler Wellenlänge (190-400 nm), Spectro Monitor III, Modell 1204 A (Milton Roy)
- F. Einkanalschreiber (Latek)
- G. Mikroliterspritzen zur Probenaufgabe von 0 - 50 μl Inhalt (Hamilton)

3.2 R e a g e n z i e n

- A. Dichlormethan, reinst (Merck Nr. 6049)
- B. Ethylacetat zur Analyse (Merck Nr. 9623)
- C. Acetonitril zur Synthese (Merck Nr. 800015)
- D. n-Hexan, reinst (Merck Nr. 4368)
- E. Methanol zur Analyse (Merck Nr. 6009)
- F. Wasser, destilliert
- G. Essigsäure (96%) zur Analyse (Merck Nr. 62)
- H. Natriumacetat, krist. reinst (Merck Nr. 6265)
- I. Acetatpufferlösung: wäßrige Natriumacetatlösung
0,01 mol/l mit wäßriger Essigsäure 0,01 mol/l auf
pH 4,8 einstellen.
- J. Mobile Phase (HPLC): Acetatpuffer (pH 4,8)-Acetonitril
(70 + 30)

Die Lösungsmittel Dichlormethan, Ethylacetat, Acetonitril, n-Hexan, Methanol und Wasser wurden vor Gebrauch destilliert. Die fertige mobile Phase für die HPLC-Bestimmung wurde filtriert und mittels Ultraschall entgast.

3.3 H e r s t e l l u n g v o n E i c h - l ö s u n g e n

Die Eichlösungen, die als Referenzstandard und zur Quantifizierung von Furazolidonrückständen dienten, wurden folgendermaßen hergestellt:

- | | |
|-------------------|--|
| Stammlösung: | 50 mg Furazolidon in 50 ml Acetonitril gelöst (1 mg/ml) |
| Standardlösung I: | 5 ml Stammlösung auf 50 ml mit mobiler Phase aufgefüllt
(100 ng/ μ l) |

Standardlösung II:	5 ml Standardlösung I auf 50 ml mit mobiler Phase aufgefüllt (10 ng/ μ l)
Standardlösung III:	5 ml Standardlösung II auf 50 ml mit mobiler Phase aufgefüllt (1 ng/ μ l)
Standardlösung IV:	5 ml Standardlösung III auf 50 ml mit mobiler Phase aufgefüllt (0,1 ng/ μ l)

Die einzelnen Meßkolben wurden zum Schutz gegen Licht mit Aluminiumfolie umwickelt und im Kühlschrank aufbewahrt. Die Stammlösung diente zur wöchentlichen Erneuerung der Standardlösungen.

3.4 A r b e i t s b e d i n g u n g e n

Als Trennsäule wurde eine Stahlsäule von 25 cm Länge und 4,6 mm Innendurchmesser eingesetzt. Die Füllung der Fertigsäule aus dem Reversed-phase-Trägermaterial Spherisorb ODS, Korngröße 5 μ m (Laboratory data control Nr., 920161078). Eine mittlere Korngröße von 5 μ m erschien uns für eine gute Trennleistung und relativ kurze Analysenzeit als geeignet. Zum Schutz der Trennsäule vor Verunreinigungen wurde zwischen dem Probenaufgabeventil und der analytischen Säule eine Vorsäule von 6 cm Länge und einem 4,6 mm Innendurchmesser mit Perisorb RP-18, Korngröße 30-40 μ m (Merck Nr. 10437), eingebaut. Bei der Reversed-phase Chromatographie werden in der Regel Methanol-Wasser-Gemische oder Acetonitril-Wasser-Gemische als mobile Phase eingesetzt. Von den getesteten Elutionsmitteln erwies sich ein von PETZ (1982 a) eingesetztes Acetatpuffer-Acetonitril-Gemisch für die HPLC-Bestimmung von Furazolidon als geeignet. Eine optimale Elution von Furazolidon wurde mit einem modifizierten Acetatpuffer 0,01 mol/l (pH 4,8) und Ace-

tonitril (70 + 30) erreicht. Bei einer Durchflußrate von 1 ml/min lag die Retentionszeit für Furazolidon bei 7,0 Minuten. Die Messung erfolgte mit einem UV-Detektor bei 360 nm nahe dem Absorptionsmaximum für Furazolidon.

3.4.1 Standardabweichung von Meßergebnissen aufgrund der Einspritztechnik

Die Reproduzierbarkeit der Bestimmungen ist weitgehend von persönlichen und laboratoriumsbedingten Einflüssen des angewandten Analyseverfahrens abhängig. Die Standardabweichung stellt eine statistische Kennziffer zur Charakterisierung der Genauigkeit von Meßwerten dar. Um die Reproduzierbarkeit der Einspritztechnik zu überprüfen, wurde aus einer Reihe von Meßwerten die Standardabweichung ermittelt. Sie sollte weniger als +3% betragen (BONELLI, 1965).

Die Überprüfung der Einspritztechnik erfolgte unter folgenden HPLC-Bedingungen:

Mobile Phase: Acetatpuffer (pH 4,8) - Acetonitril (70 + 30)

Durchflußrate: 1 ml/min

Wellenlänge: UV 360 nm

Detektor-Empfindlichkeit: 0,01 AUFS

Probenschleife: 50 µl

Injektionsvolumen: 10 µl

Es wurden zehnmal hintereinander je 10 µl eines Furazolidon-Standards eingespritzt, der 1 ng pro 1 µl enthielt, und die Wiederholbarkeit der Meßergebnisse geprüft (Tabelle 2).

Tab. 2: Wiederholbarkeit der Meßergebnisse bei gleicher Einspritztechnik

Analyse Nr.	Peakhöhe (in mm)	Differenz zu $\bar{x}$
1	91,0	+ 0,4
2	91,0	+ 0,4
3	89,5	- 1,1
4	90,0	- 0,6
5	89,0	- 1,6
6	89,5	- 1,1
7	90,5	- 0,1
8	90,0	- 0,6
9	93,0	+ 2,4
10	92,5	+ 1,9
n= 10	$\bar{x}$ = 90,6 $\pm 1,308$	

Bei Einspritzung von je 10 μ l eines Furazolidon-Standards, der 1 ng pro 1 μ l enthielt, betrug der Mittelwert der Peakhöhen 90,6 mm, die Standardabweichung $\pm 1,308$ und der Variationskoeffizient 1,44%.

Der niedrige Variationskoeffizient von 1,44% zeigt, daß die Einspritztechnik hinreichend genau war, um bei den folgenden Versuchen reproduzierbare Ergebnisse erwarten zu können.

3.4.2 Reproduzierbarkeit und Linearität von Messungen

Für eine einwandfreie Auswertung der Peaks wurden die unter 3.4.1 genannten, für die Bestimmung optimalen Geräteeinstellungen durch Wiederholungsuntersuchungen getestet. Um die Reproduzierbarkeit und Linearität von Messungen zu zeigen, wurden sechs verschiedene Konzentrationen von Furazolidon eingespritzt und Mittelwert ($\bar{x}$), Standardabweichung (s), Variationskoeffizient (VK) und der Korrelationskoeffizient (r) der Peakhöhen (mm) von je fünf Einspritzungen ermittelt (Tabelle 3, Abbildung 2).

Tab. 3: Peakhöhe und Furazolidonkonzentration

Peakhöhe (in mm) bei einer Furazolidonkonzentration von						
	0,3	0,5	1,0	3,0	5,0	10,0 $\frac{ng}{10\mu l}$
	3,0	5,0	11,5	27,0	41,0	91,0
	3,0	4,0	10,5	27,0	43,5	91,0
	2,5	6,0	10,5	28,0	44,0	89,5
	3,0	5,0	10,0	26,0	46,0	90,0
	2,5	5,0	10,5	27,0	45,5	89,5
$\bar{x}$	2,8	5,0	10,6	27,0	44,0	90,2
s	$\pm 0,27$	$\pm 0,71$	$\pm 0,55$	$\pm 0,71$	$\pm 1,97$	$\pm 0,76$
VK	9,64	14,2	5,19	2,63	4,48	0,84

Wie aus der Tabelle 3 ersichtlich, beträgt die maximale Streuung der Meßwerte 14,2% (VK).

Die daraus resultierende Eichkurve ist in Abbildung 2 dargestellt. Wie der Korrelationskoeffizient von + 0,9993 zeigt, ist die Linearität bis 10 ng/10 µl gewährleistet.

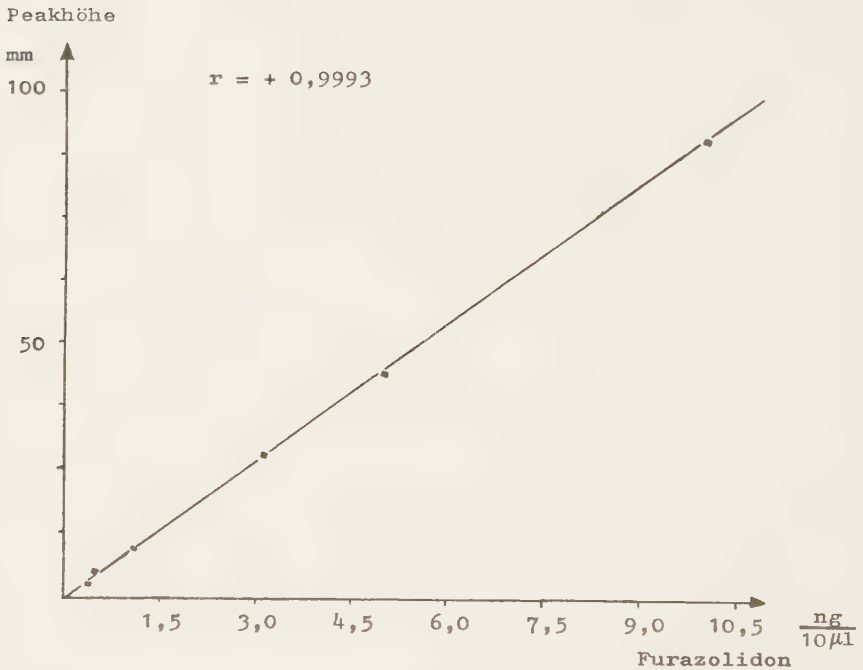


Abb. 2: Eichkurve von Furazolidon

3.4.3 Beurteilung der Vorversuche

Die Reproduzierbarkeit und Linearität von Messungen unter den genannten HPLC-Bedingungen (3.1 und 3.4.1) sind gegeben. Die Brauchbarkeit der HPLC zur Rückstandsanalyse von Furazolidon wird entscheidend von Säulenparametern mitbestimmt. Sie stehen für Trennleistung, Nachweisgrenze, Lösungsmittelverbrauch und Analysenzeit. Die stationäre Phase Spherisorb ODS mit einer mittleren Teilchengröße von 5 μm erbrachte gute Trennleistung und kurze Analysenzeiten.

Der Innendurchmesser der Trennsäule von 4,6 mm und die Säulenlänge von 25 cm wurden so gewählt, weil damit ein optimales Verhältnis zwischen Trennleistung, Elutionsmittelverbrauch und Analysenzeit gegeben war. Längere Säulen besitzen zwar eine höhere Kapazität, verbrauchen aber mehr Lösungsmittel und erfordern eine längere Analysenzeit.

Zum Schutz der wertvollen Trennsäule vor Verunreinigungen und damit zur Verlängerung der Lebensdauer wurde hinter dem Injektionsventil eine Vorsäule eingebaut.

Mit der mobilen Phase Acetatpuffer (pH 4,8)-Acetonitril (70 + 30) wurde eine gute Trennleistung und eine vertretbare Analysenzeit erreicht. Die Kapazität und Selektivität des Systems, die Retentionszeit und damit auch die Analysendauer sind vom pH-Wert und dem Mischungsverhältnis der mobilen Phase abhängig, die auch bei der Herstellung genau beachtet werden mußten.

Je höher die Flußrate des Elutionsmittels gewählt wurde, desto kürzer war die Analysenzeit. Die Erhöhung war jedoch nur soweit möglich, wie es der Verlust an Auflösung erlaubte. Die gewählte Durchflußrate von 1 ml/min ergab eine gute Auflösung. Bei dieser Durch-

flußgeschwindigkeit von 1 ml/min betrug die Retentionszeit für Furazolidon 7,0 min.

Die Verwendung von Methanol-Wasser-Gemischen mit oder ohne Acetatpuffer als mobile Phase führten zu verbreiterten Furazolidon-Peaks und somit zu einer schlechteren Nachweisempfindlichkeit.

Die für Furazolidon in der Literatur angegebenen Wellenlängen lagen im UV-Bereich zwischen 360 nm und 380 nm. Mit dem variablen UV-Detektor Spectro-Monitor III wurde für Furazolidon unter Verwendung der mobilen Phase Acetatpuffer (pH 4,8)-Acetonitril (70 + 30) ein Absorptionsmaximum bei 360 nm ermittelt. Die untere Grenze der Bestimmbarkeit für Furazolidon lag bei 0,2 ng.

3.5 P r o b e n a u f a r b e i t u n g (Extraktions- und Reinigungsverfahren)

Wegen der außerordentlichen großen Lichtempfindlichkeit von Furazolidon müssen alle Arbeitsgänge stets vor direkter Lichteinwirkung geschützt durchgeführt werden. Die Verwendung von Braunglasgefäßen ist Voraussetzung für die Erzielung einer guten Wiederfindungsrate. Lichtdurchlässige Gläser können vorteilhaft mit Aluminiumfolie umwickelt werden. Sämtliche Arbeiten wurden durch Herablassen der Jalousien in halbverdunkelten Laborräumen ausgeführt. Nach PETZ (1982 a) verringerten sich die Gehalte von 5-Nitrofuranen beim Stehenlassen einer Eichlösung auf dem Labortisch innerhalb von vier Stunden um 40 - 50%. In eigenen Versuchen (3.7.1) wurde der rasche Abbau von Furazolidon durch Lichteinwirkung bestätigt.

Bei der Modifizierung von Methoden wurde großer Wert auf Schnelligkeit und Eignung für Serienuntersuchungen gelegt. Zur Vermeidung von Furazolidon vortäuschenden Peaks und zur Erreichung einer größeren Empfindlichkeit bei der HPLC-Bestimmung wurden sämtliche Lösungsmittel destilliert. Die wöchentlich frisch hergestellte mobile Phase wurde zusätzlich noch filtriert und mittels Ultraschall entgast.

3.5.1 Reinigung und Vorbereitung von Geräten

Vor Durchführung jeder Analyse wurden alle Glaswaren mit Leitungswasser und Laborspülmittel (Extran MA 01 alkalisch, Merck Nr. 7555), destilliertem Wasser und Aceton sorgfältig gereinigt und für ca. eine Stunde in den Trockenschrank gestellt. Das HPLC-Probenaufgabesystem und die Injektionsspritze müssen nach jeder Probenaufgabe mit Methanol und mobiler Phase gereinigt werden. Es ist sehr vorteilhaft, die Vorsäule und die Trennsäule nach jeder größeren Untersuchungsreihe über Nacht zu spülen und zu regenerieren.

3.5.2 Aufarbeitung von Leber-, Nieren- und Fleischproben

Als Grundlage diente ein von WINTERLIN et al. (1981) beschriebenes Extraktionsverfahren, während die Extraktreinigung modifiziert wurde.

5 g vorzerkleinertes Untersuchungsmaterial wurden in ein

Zentrifugenglas eingewogen. Nach Zugabe von 50 ml Dichlormethan wurde die Probe ca. eine Minute lang mittels Ultra-Turrax homogenisiert. Der Ultra-Turrax-Stab wurde mit 20 ml Dichlormethan gewaschen und die Waschflüssigkeit in das Zentrifugenglas gegeben. Anschließend erfolgte das Zentrifugieren des Homogenisats für sieben Minuten bei etwa 1789 x g. Die überstehende wäßrige Phase wurde abgesaugt und verworfen, während die Dichlormethanphase durch ein Schwarzbandfilter in einen 250-ml-Braunglaskolben filtriert wurde. Der Extrakt wurde bei einer Wasserbadtemperatur von max. 40°C im Rundkolben mittels Vakuumrotationsverdampfer zur Trockne eingengt und der Rückstand in 5 ml n-Hexan gelöst. Nach Zugabe von 3 ml Essigsäure 0,01 mol/l wurde der Rundkolben kurz geschüttelt und der Kolbeninhalt in ein 15-ml-Reagenzglas gefüllt. Die Emulgierung erfolgte für etwa eine Minute mittels Reagenzglas-schüttler. Nach dem Zentrifugieren für etwa fünf Minuten bei 1789 x g wurde die obere n-Hexanphase in ein zweites 15-ml-Reagenzglas überführt, während die saure Phase im ersten Reagenzglas aufgehoben wurde. Der 250-ml-Rundkolben wurde mit 2 ml n-Hexan ausgewaschen. Die Waschflüssigkeit kam in das zweite Reagenzglas und nach Zugabe von 2 ml Essigsäure 0,01 mol/l wurde eine Minute lang emulgiert. Die Trennung in zwei Phasen erfolgte durch Zentrifugation. Nach Entfernung der oberen n-Hexanphase wurde die untere saure Phase in das erste Reagenzglas gegeben. Das Furazolidon wurde dann dreimal mit je 4 ml Dichlormethan reextrahiert, wobei nach jeder Phasentrennung die untere Dichlormethanphase mit einer Pasteurpipette aufgehoben und über ein kleines Faltenfilter in einen 25-ml-Braunglasspitzkolben filtriert wurde. Nach Einengung des Extraktes mittels Vakuumrotationsverdampfer erfolgte die Lösung des Rückstands in 200 µl Methanol-mobiler Phase (1 + 1) und die Injektion von 50 µl Extraktlösung in das Probenaufgabeventil der HPLC-Apparatur. Bei höheren Furazolidongehalten wurden entsprechende Verdünnun-

gen mit Methanol-mobiler Phase (1 + 1) vorgenommen. Der gesamte Arbeitsgang ist schematisch wiedergegeben (Abbildung 3).

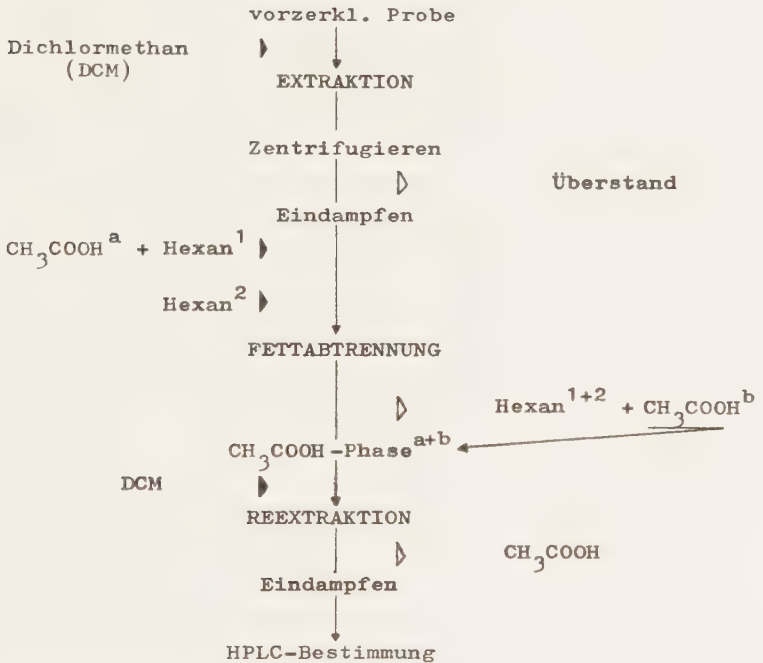


Abb. 3: Aufarbeitungsschema für Fleisch- und Organproben

3.5.3 Aufarbeitung von Blut- und Blutplasma-proben

Bei der Erarbeitung des Analyseverfahrens wurde auf eine Methode von VEALE und HARRINGTON (1982) zurückgegriffen. Die Technik zur Probenaufarbeitung wurde wie folgt modifiziert: 1 ml (max. 2 ml) Blut oder Plasma wurden mit einer geeichten Enzympipette in ein mit Aluminiumfolie umwickeltes 15-ml-Reagenzglas pipettiert. Nach Zugabe von 5 ml Ethylacetat wurde eine Minute mittels Reagenzglasschüttler homogenisiert, fünf Minuten bei ca. 1789 x g zentrifugiert und der Überstand mittels Pipette in einem 25-ml-Braunglassspitzkolben pipettiert. Der Extraktionsvorgang wurde drei- bis viermal mit je 5 ml Ethylacetat wiederholt. Die im Spitzkolben vereinigten Ethylacetatphasen wurden bei einer Wasserbadtemperatur von max. 40°C mit dem Vakuumrotationsverdampfer schonend zur Trockne eingeengt. Danach erfolgte die Lösung des Rückstands in 200 µl eines Gemischs aus Acetatpuffer (pH 4,8)-Acetonitril (70 + 30) und Methanol im Verhältnis 1 + 1. Nach Zugabe von 1 - 2 ml n-Hexan wurde der Extrakt emulgiert, mittels Eppendorf-Enzympipette quantitativ in ein 15-ml-Zentrifugenglas überführt und ca. zehn Minuten bei ca. 1789 x g zentrifugiert. 50 µl der unteren Phase wurden nach Absaugen der oberen n-Hexanphase direkt in die HPLC-Apparatur eingespritzt. Eine schematische Darstellung der Aufarbeitung zeigt Abbildung 4.

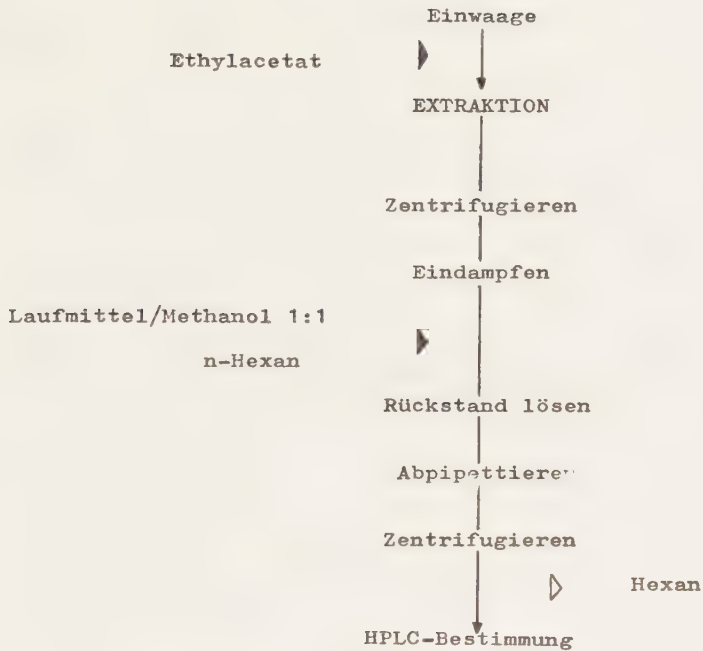


Abb. 4: Aufarbeitungsschema für Blut- und Blutplasma-proben

3.5.4 Aufarbeitung von Harnproben

Für die Aufarbeitung von Harnproben mußte das für Blut und Plasma gewählte Verfahren nur an zwei Positionen geändert werden. Zunächst wurde die Harnprobe (1 ml Einwage) mit NaHCO_3 -Lösung 0,1 mol/l auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie bei Blut und Plasma beschrieben bis zum Lösen des Rückstands in 200 μl des Gemischs Acetatpuffer (pH 4,8)-Acetonitril und Methanol im Verhältnis 1 + 1. Auf weitere Reinigungsschritte konnte bei der Aufarbeitung der Harnproben verzichtet werden. Das Schema des Arbeitsvorganges ist der Abbildung 5 zu entnehmen.

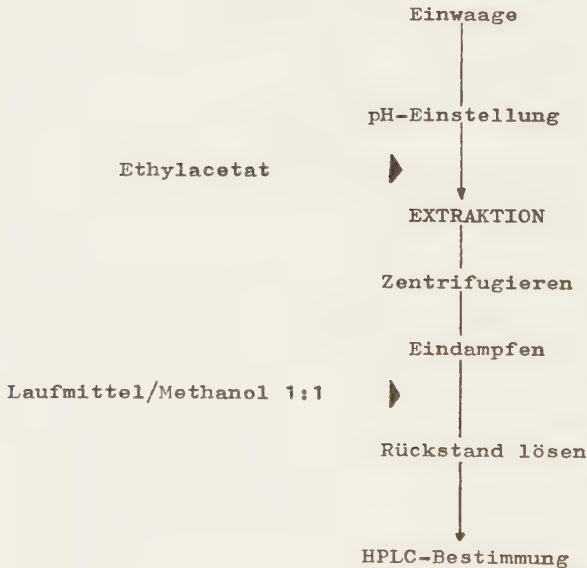


Abb. 5: Aufarbeitungsschema für Harnproben

3.5.5 Qualitative und quantitative Auswertung der Chromatogramme

Qualitativer Nachweis

Der qualitative Nachweis einer Substanz erfolgt durch Messung der Zeit, die eine Substanz von der Probenaufgabe (Injektion der Probe) bis zum Erreichen des Absorptionsmaximums (Peakmaximum) benötigt. Die Identifizierung einer Substanz kann durch Aufzeichnung einer Analyse mittels Registrierschreiber erheblich vereinfacht werden. Auf dem Chromatogramm kann die Retentionszeit einer Substanz sowohl durch die Wegstrecke (cm) als auch durch die Zeit (min) bestimmt werden. In der Praxis vergleicht man die Retentionszeit einer Eichsubstanz mit dem Peak einer Probe. Wird hierbei die gleiche Retentionszeit festgestellt, dann können beide Substanzen identisch sein. Eine Mischung aus Eich- und Probelösung kann ebenfalls zur Identifizierung herangezogen werden, wobei der fragliche Peak höher werden soll ohne irgendwelche Schultern oder Verbreiterungen zu zeigen.

Quantitative Bestimmung

Zur quantitativen Bestimmung des Furazolidongehaltes in einer Probe wurde auf die Methode des externen Standards zurückgegriffen, wobei die Peakhöhe der Probelösung im Chromatogramm mit der Peakhöhe einer Furazolidon-Eichlösung bekannter Konzentration verglichen wird. Bei den Untersuchungen wurde darauf geachtet, daß die injizierten Gehalte der Furazolidon-Eichlösungen in etwa den Furazolidonkonzentrationen der Proben entsprachen. Sämtliche Messungen wurden im linearen Meßbereich des UV-Detektors durchgeführt. Aus diesem Grund wurden Proben mit sehr hohen Furazolidongehalten entsprechend verdünnt. Zu

jeder Serie gehörten außerdem mindestens drei Eichwerte mit unterschiedlichen Furazolidonkonzentrationen, die ebenfalls zur Auswertung herangezogen wurden.

Bei der Auswertung wird zunächst der Furazolidongehalt der eingespritzten Probelösung mittels Eichkurve oder Standardlösung ermittelt. Anschließend wird der Furazolidongehalt der Probe unter Berücksichtigung der Einwaage und der Verdünnungsfaktoren nach folgender Formel bestimmt:

$$\begin{array}{rcl}
 \begin{array}{l} \text{Furazolidongehalt} \\ \text{der injizierten} \\ \text{Probe in ng} \end{array} & \times & \begin{array}{l} \text{Gesamt-} \\ \text{volumen} \\ \text{in } \mu\text{l} \end{array} \\
 \hline
 \begin{array}{l} \text{Einwaage} \\ \text{in g} \end{array} & \times & \begin{array}{l} \text{injiziertes} \\ \text{Volumen in } \mu\text{l} \end{array}
 \end{array}
 = \frac{\text{ng Furazolidon}}{\text{pro g Probe}} = \mu\text{g/kg}$$

3.6 W i e d e r f i n d u n g s r a t e n

Die Kontrollproben für die Wiederfindungsversuche mit Furazolidon wurden vorsorgehalber auf eventuell vorhandene Furazolidonrückstände untersucht. Für die Versuche wurden nur rückstandsfreie Proben verwendet.

3.6.1 Künstliche Kontamination von Fleisch-, Leber- und Nierenproben

Jeweils drei verschiedene Furazolidonkonzentrationen wurden zu den Fleisch- und Organeinwaagen in die Zentrifugengläser in der folgenden Weise gegeben und nach der unter 3.5.2 beschriebenen Analysenvorschrift behandelt:

Konzentration I

5 g Probe + 5 ng Furazolidon ($\hat{=}$ 1 $\mu\text{g/kg}$)

Konzentration II

5 g Probe + 25 ng Furazolidon ($\hat{=}$ 5 $\mu\text{g/kg}$)

Konzentration III

5 g Probe + 100 ng Furazolidon ($\hat{=}$ 20 $\mu\text{g/kg}$)

Der Rückstand wurde nach der Aufarbeitung jeweils in 500 μl Methanol-mobiler Phase (1 + 1) gelöst.

Injektion: jeweils 50 μl

HPLC-Bedingungen: nach 3.1 und 3.4.1

3.6.2 Künstliche Kontamination von heparinisiertem Blut

Jeweils 10 ml heparinisiertes Blut mit Furazolidonzusätzen von 1, 5 und 20 $\mu\text{g/l}$ wurden zur Plasmagewinnung zehn Minuten lang bei ca. 1789 x g zentrifugiert. Mit einem aliquoten Teil von 2 ml Plasma erfolgte die weitere Aufarbeitung nach dem unter 3.5.3 angegebenen Verfahren.

Die Rückstände wurden nach der Extraktreinigung jeweils in 200 μl Methanol-mobiler Phase (1 + 1) gelöst.

Injektion: jeweils 50 μl

HPLC-Bedingungen: nach 3.1 und 3.4.1

3.6.3 Künstliche Kontamination von Harn

Die Zugabe von Furazolidon zu den Harnproben erfolgte nach der Einwaage von jeweils 2 ml und noch vor der pH-Wert-Einstellung auf pH 7,5 in folgender Weise:

Konzentration I

2 ml Harn + 2 ng Furazolidon ($\pm 1 \mu\text{g/l}$)

Konzentration II

2 ml Harn + 10 ng Furazolidon ($\pm 5 \mu\text{g/l}$)

Konzentration III

2 ml Harn + 40 ng Furazolidon ($\pm 20 \mu\text{g/l}$)

Die Rückstände wurden nach der Aufarbeitung, wie unter 3.5.3 und 3.5.4 angegeben, jeweils in 200 μl Methanol-mobiler Phase (1 + 1) gelöst.

Injektion: jeweils 50 μl

HPLC-Bedingungen: nach 3.1 und 3.4.1

Die Wiederfindungsraten bei den drei unterschiedlichen Konzentrationen variierten zwischen 70% und 90%. Lediglich beim Schweineharn mit einem Gehalt von 1 $\mu\text{g/l}$ Furazolidon lag die Wiederfindungsrate bei nur 54,76%.

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 4 - 13 dargestellt. Die Abbildungen 6 - 15 zeigen Chromatogramme von Furazolidon aus Leber, Niere, Muskel, Plasma und Harn im Rahmen der Untersuchungen zur Bestimmung der Wiederfindungsrate.

Tab. 4:

Wiederfindungsraten von Furazolidon in Leber (K A L B)

Furazolidon- zusatz ($\mu\text{g/kg}$)	ermittelter Furazolidon- gehalt der Injektion ($\text{ng}/50 \mu\text{l}$)	Wiederfindung (%)
1,0	0,392	78,43
	0,424	84,96
	0,424	84,96
	0,392	78,43
	0,392	78,43
	$\bar{x}$ 0,40	$\bar{x}$ 81,04
		s $\pm 3,58$
		VK 4,41
5,0	1,732	69,28
	1,764	70,58
	1,797	71,89
	1,764	70,58
	1,862	74,50
	$\bar{x}$ 1,78	$\bar{x}$ 71,37
		s $\pm 1,98$
		VK 2,77
20,0	6,838	68,38
	7,032	70,32
	6,516	65,16
	7,387	73,87
	7,419	74,19
	$\bar{x}$ 7,04	$\bar{x}$ 70,38
		s $\pm 3,81$
		VK 5,41

$\bar{x}$ = Mittelwert

s = Standardabweichung

VK = Variationskoeffizient

Tab. 5:

Wiederfindungsraten von Furazolidon in Niere (K A L B)

Furazolidon- zusatz ($\mu\text{g/kg}$)	ermittelter Furazolidon- gehalt der Injektion ($\text{ng}/50 \mu\text{l}$)	Wiederfindung (%)
1,0	0,392	78,43
	0,392	78,43
	0,424	84,96
	0,457	91,50
	0,359	71,89
	$\bar{x}$ 0,40	$\bar{x}$ 81,04
		s $\pm 7,45$
		VK 9,19
5,0	1,830	73,20
	1,764	70,58
	2,026	81,04
	1,895	75,81
	1,993	79,73
	$\bar{x}$ 1,90	$\bar{x}$ 76,07
		s $\pm 4,37$
		VK 5,74
20,0	7,108	71,08
	6,802	68,02
	7,278	72,78
	7,482	74,82
	7,755	77,55
	$\bar{x}$ 7,29	$\bar{x}$ 72,85
		s $\pm 3,62$
		VK 4,96

$\bar{x}$ = Mittelwert

s = Standardabweichung

VK = Variationskoeffizient

Tab. 6:

Wiederfindungsraten von Furazolidon in Muskulatur (K A L B)

Furazolidon- zusatz ($\mu\text{g/kg}$)	ermittelter Furazolidon- gehalt der Injektion ($\text{ng/50 } \mu\text{l}$)	Wiederfindung (%)
1,0	0,451	90,32
	0,483	96,77
	0,451	90,32
	0,451	90,32
	0,419	83,87
	$\bar{x}$ 0,45	$\bar{x}$ 90,32
		s $\pm$ 4,56
		VK 5,04
5,0	1,724	68,96
	2,275	91,03
	1,724	68,96
	1,758	70,34
	1,793	71,72
	$\bar{x}$ 1,85	$\bar{x}$ 74,20
		s $\pm$ 9,48
		VK 12,77
20,0	7,414	74,14
	6,870	68,70
	7,414	74,14
	7,414	74,14
	7,108	71,08
	$\bar{x}$ 7,24	$\bar{x}$ 72,44
		s $\pm$ 2,48
		VK 3,42

$\bar{x}$ = Mittelwert

s = Standardabweichung

VK = Variationskoeffizient

Tab. 7:

Wiederfindungsraten von Furazolidon in Blut (K A L B)

Furazolidon- zusatz ($\mu\text{g}/\text{l}$)	ermittelter Furazolidon- gehalt der Injektion ($\text{ng}/50 \mu\text{l}$)	Wiederfindung (%)
1,0	0,448	89,65
	0,413	82,75
	0,413	82,75
	0,413	82,75
	0,413	82,75
	0,413	82,75
	$\bar{x}$ 0,42	$\bar{x}$ 83,90
		s $\pm$ 2,82
		VK 3,36
5,0	2,387	95,49
	2,319	92,76
	2,251	90,04
	2,216	88,67
	2,251	90,04
	1,909	76,39
	$\bar{x}$ 2,22	$\bar{x}$ 88,90
		s $\pm$ 6,60
		VK 7,42
20,0	7,972	79,72
	7,837	78,37
	7,741	77,41
	7,548	75,48
	7,837	78,37
	7,972	79,72
	$\bar{x}$ 7,82	$\bar{x}$ 78,18
		s $\pm$ 1,59
		VK 2,03

$\bar{x}$ = Mittelwert

s = Standardabweichung

VK = Variationskoeffizient

Tab. 8:

Wiederfindungsraten von Furazolidon in Harn (K A L B)

Furazolidon- zusatz ($\mu\text{g}/1$)	ermittelter Furazolidon- gehalt der Injektion ($\text{ng}/50 \mu\text{l}$)	Wiederfindung (%)
1,0	0,357	71,42
	0,428	86,71
	0,357	71,42
	0,500	100,00
	0,357	71,42
	0,285	57,14
	$\bar{x}$ 0,38	$\bar{x}$ 76,19
		s $\pm$ 14,76
		VK 19,37
5,0	2,000	80,00
	2,142	85,71
	2,285	91,42
	2,000	80,00
	2,142	85,71
	2,000	80,00
	$\bar{x}$ 2,09	$\bar{x}$ 83,81
		s $\pm$ 4,66
		VK 5,56
20,0	8,285	82,85
	8,571	85,71
	8,000	80,00
	8,285	82,85
	8,571	85,71
	8,285	82,85
	$\bar{x}$ 8,33	$\bar{x}$ 83,33
		s $\pm$ 2,15
		VK 2,58

$\bar{x}$ = Mittelwert

s = Standardabweichung

VK = Variationskoeffizient

Tab. 9:

Wiederfindungsraten von Furazolidon in Leber (S C H W E I N)

Furazolidon- zusatz ($\mu\text{g/kg}$)	ermittelter Furazolidon- gehalt der Injektion ($\text{ng}/50 \mu\text{l}$)	Wiederfindung (%)
1,0	0,451	90,32
	0,451	90,32
	0,419	83,87
	0,451	90,32
	0,483	96,77
	$\bar{x}$ 0,45	$\bar{x}$ 90,32
		s $\pm 4,56$
		VK 5,04
5,0	2,161	86,45
	2,161	86,45
	2,161	86,45
	2,258	90,32
	2,225	89,03
	$\bar{x}$ 2,19	$\bar{x}$ 87,74
		s $\pm 1,82$
		VK 2,07
20,0	8,709	87,09
	9,354	93,54
	9,032	90,32
	9,225	92,25
	9,032	90,32
	$\bar{x}$ 9,07	$\bar{x}$ 90,70
		s $\pm 2,44$
		VK 2,69

$\bar{x}$ = Mittelwert

s = Standardabweichung

VK = Variationskoeffizient

Tab. 10:

Wiederfindungsraten von Furazolidon in Niere (S C H W E I N)

Furazolidon- zusatz ($\mu\text{g/kg}$)	ermittelter Furazolidon- gehalt der Injektion ($\text{ng}/50 \mu\text{l}$)	Wiederfindung (%)
1,0	0,457	91,50
	0,392	78,43
	0,392	78,43
	0,490	98,03
	0,392	78,43
	$\bar{x}$ 0,42	$\bar{x}$ 84,96
		s $\pm 9,24$
		VK 10,87
5,0	1,830	73,20
	1,764	70,58
	1,677	67,09
	1,612	64,51
	1,935	77,41
	$\bar{x}$ 1,76	$\bar{x}$ 70,56
		s $\pm 5,06$
		VK 7,17
20,0	8,774	87,74
	8,935	89,35
	8,967	89,67
	8,935	89,35
	8,967	89,67
	$\bar{x}$ 8,92	$\bar{x}$ 89,16
		s $\pm 0,81$
		VK 0,90

$\bar{x}$ = Mittelwert

s = Standardabweichung

VK = Variationskoeffizient

Tab. 11:

Wiederfindungsraten von Furazolidon in Muskel (S C H W E I N)

Furazolidon- zusatz ($\mu\text{g/kg}$)	ermittelter Furazolidon- gehalt der Injektion ($\text{ng}/50 \mu\text{l}$)	Wiederfindung (%)
1,0	0,451	90,32
	0,354	70,96
	0,451	90,32
	0,387	77,41
	0,387	77,41
	$\bar{x}$ 0,41	$\bar{x}$ 81,28
		s $\pm 8,66$
		VK 10,65
5,0	1,827	73,10
	1,862	74,48
	1,862	74,48
	1,862	74,48
	1,896	75,86
	$\bar{x}$ 1,86	$\bar{x}$ 74,48
		s $\pm 0,98$
		VK 1,31
20,0	6,938	69,38
	7,210	72,10
	7,142	71,42
	7,210	72,10
	7,142	71,42
	$\bar{x}$ 7,13	$\bar{x}$ 71,28
		s $\pm 1,12$
		VK 1,57

$\bar{x}$ = Mittelwert

s = Standardabweichung

VK = Variationskoeffizient

Tab. 12:

Wiederfindungsraten von Furazolidon in Blut (S C H W E I N)

Furazolidon- zusatz ($\mu\text{E}/1$)	ermittelter Furazolidon- gehalt der Injektion (ng/50 μl)	Wiederfindung (%)
1,0	0,344	68,96
	0,344	68,96
	0,448	89,65
	0,413	82,75
	0,413	82,75
	0,379	75,86
	$\bar{x}$ 0,39	$\bar{x}$ 78,16
		s $\pm$ 8,35
		VK 10,68
5,0	1,931	77,24
	1,931	77,24
	1,862	74,48
	1,862	74,48
	1,931	77,24
	1,862	74,48
	$\bar{x}$ 1,90	$\bar{x}$ 75,86
		s $\pm$ 1,51
		VK 1,99
20,0	7,800	78,00
	7,866	78,66
	7,200	72,00
	7,200	72,00
	7,000	70,00
	7,066	70,66
	$\bar{x}$ 7,36	$\bar{x}$ 73,55
		s $\pm$ 3,79
		VK 5,15

$\bar{x}$ = Mittelwert

s = Standardabweichung

VK = Variationskoeffizient

Tab. 13:

Wiederfindungsraten von Furazolidon in Harn (S C H W E I N)

Furazolidon- zusatz ($\mu\text{g/l}$)	ermittelter Furazolidon- gehalt der Injektion ($\text{ng}/50 \mu\text{l}$)	Wiederfindung (%)
1,0	0,214	42,85
	0,285	57,14
	0,214	42,85
	0,285	57,14
	0,285	57,14
	0,357	71,42
	$\bar{x}$ 0,27	$\bar{x}$ 54,76 s $\pm 10,75$ VK 19,63
5,0	2,285	91,42
	2,142	85,71
	1,928	77,14
	1,857	74,28
	2,000	80,00
	1,928	77,14
	$\bar{x}$ 2,03	$\bar{x}$ 80,95 s $\pm 6,43$ VK 7,94
20,0	8,000	80,00
	8,142	81,42
	8,142	81,42
	8,285	82,85
	8,000	80,00
	8,142	81,42
	$\bar{x}$ 8,12	$\bar{x}$ 81,19 s $\pm 1,07$ VK 1,31

$\bar{x}$ = Mittelwert

s = Standardabweichung

VK = Variationskoeffizient

Die in den Abbildungen 6 - 11 wiedergegebenen Chromatogramme von Furazolidon sind wie folgt zu kommentieren:

Peak A = 100 ng Furazolidon / 5 g Einwaage (= 20 µg/kg)

Peak B = 25 ng Furazolidon / 5 g Einwaage (= 5 µg/kg)

Peak C = 5 ng Furazolidon / 5 g Einwaage (= 1 µg/kg)

Rückstand: jeweils in 500 µl Methanol-Laufmittel-Gemisch
(1 + 1) gelöst

Injektion: jeweils 50 µl

Eichlösungen: Standardlösung III: Injektion 10 µl = 10 ng

Standardlösung IV: Injektion 10 µl = 1 ng

HPLC-Bedingungen: Wellenlänge von 360 nm

Detektorempfindlichkeit von 0,005 AUFS

Für die in den Abbildungen 12 - 15 gezeigten Chromatogramme gilt:

Peak A = 40 ng Furazolidon / 2 ml Einwaage (= 20 µg/l)

Peak B = 10 ng Furazolidon / 2 ml Einwaage (= 5 µg/l)

Peak C = 2 ng Furazolidon / 2 ml Einwaage (= 1 µg/l)

Rückstand: jeweils in 200 µl Methanol-Laufmittel-Gemisch
(1 + 1) gelöst

Injektion und Eichlösungen: wie oben angegeben

HPLC-Bedingungen: Wellenlänge von 360 nm

Detektorempfindlichkeit:

Abb. 12, 13: 0,005 AUFS

Abb. 14, 15: 0,01 AUFS

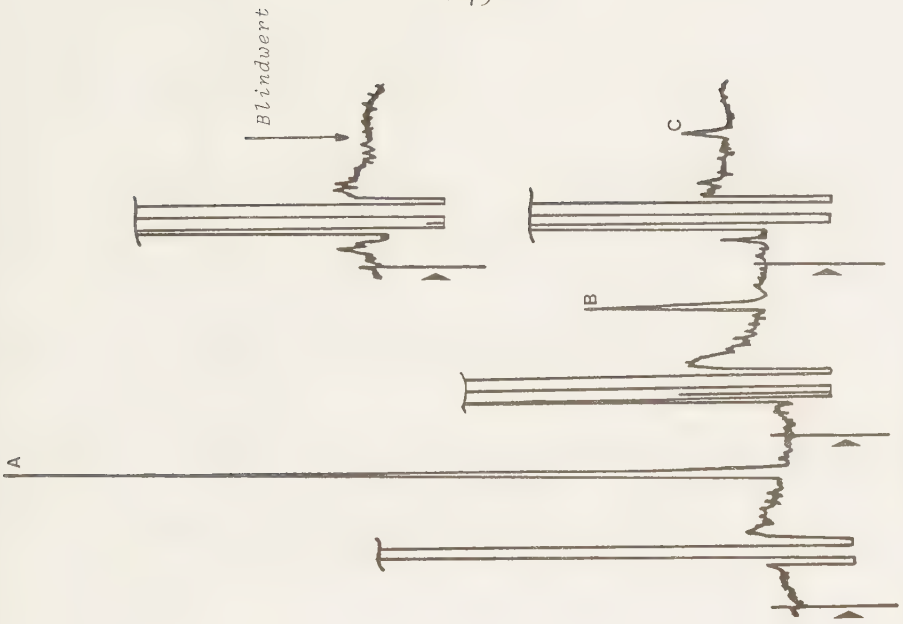


Abb. 7: Schweineleber

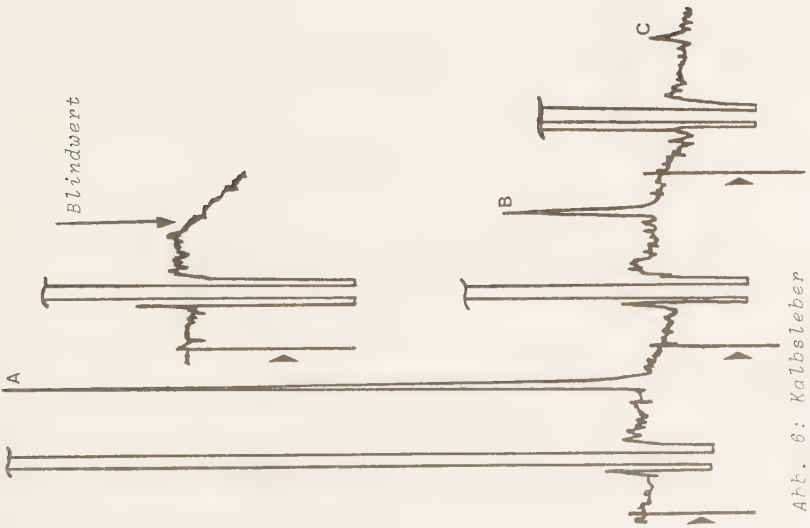


Abb. 6: Kalbsleber

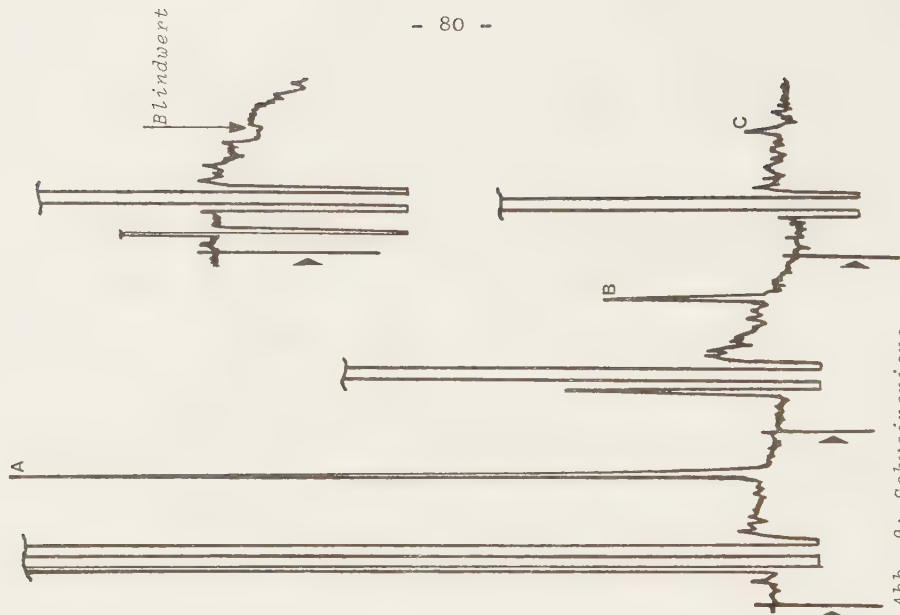


Abb. 9: Schweineiere

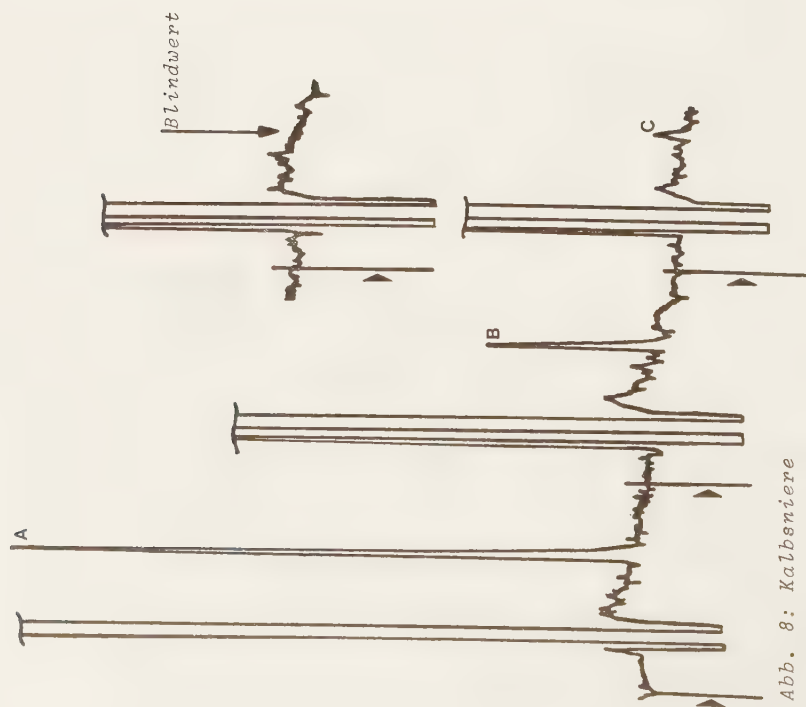


Abb. 8: Kalbsmiiere

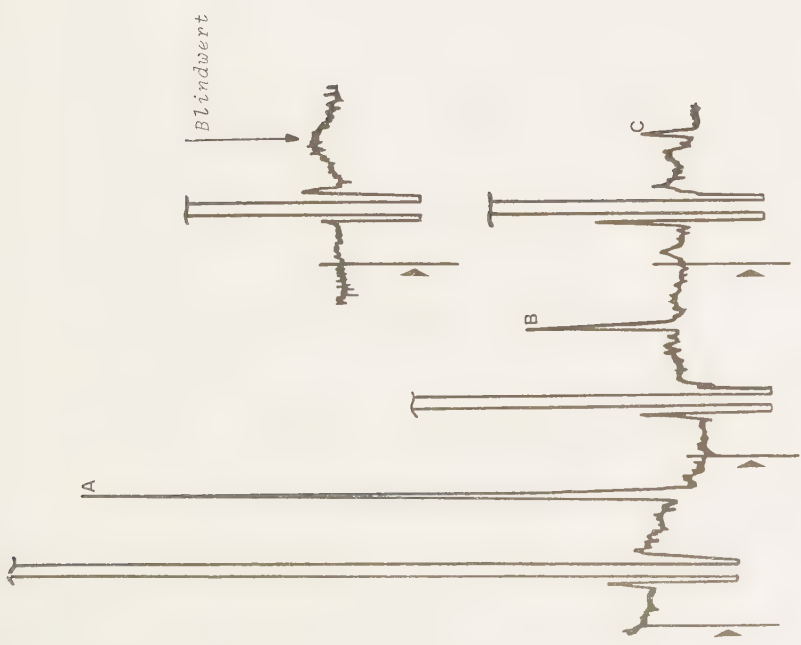


Abb. 10: Nieremuskel

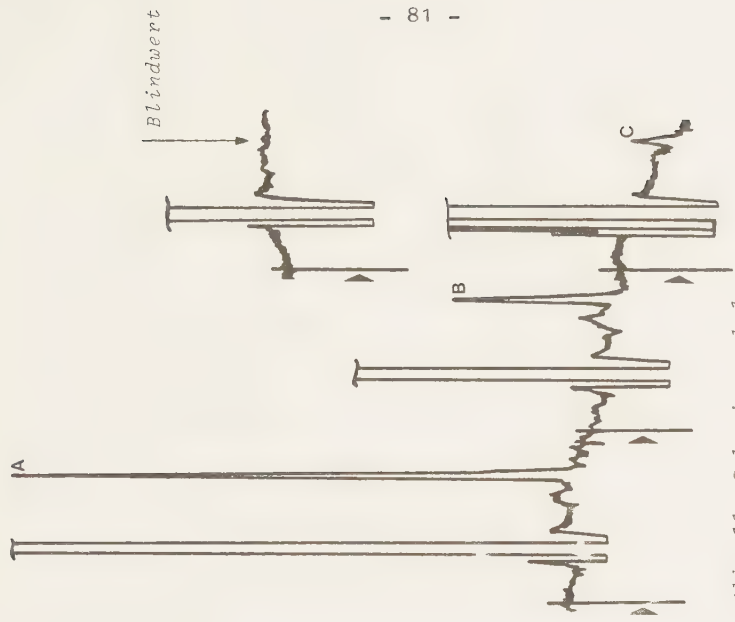


Abb. 11: Schweinemuskel

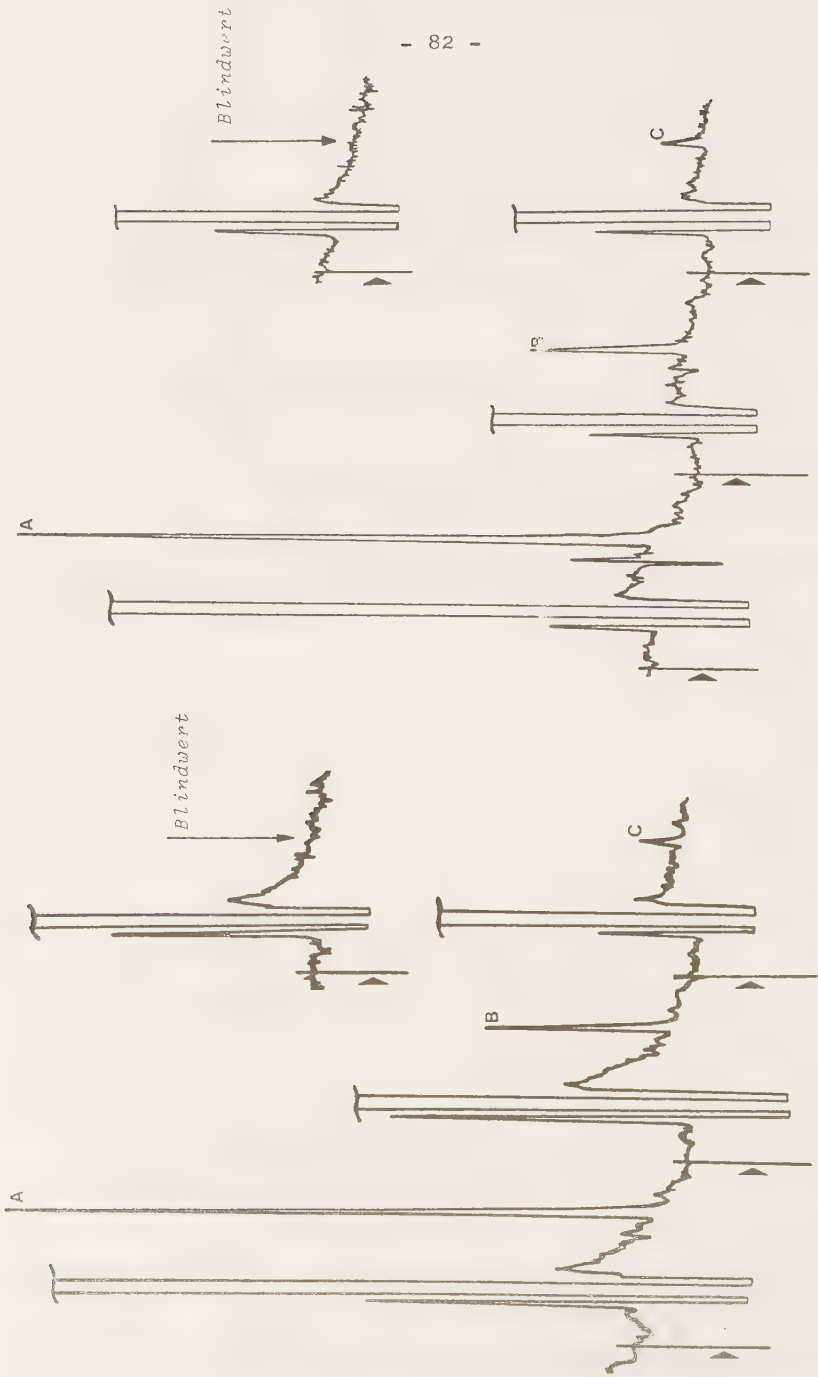


Abb. 13: Schweineplasma

Abb. 12: Kalbsplasma

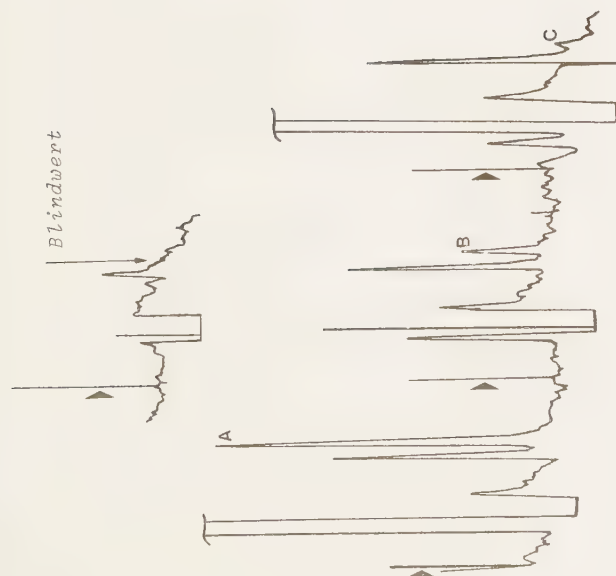


Abb. 14: Kalbsharn

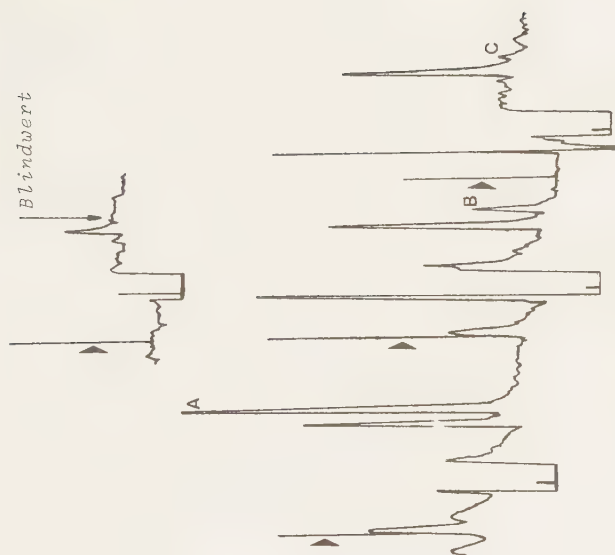


Abb. 15: Schweineharn

3.6.4 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze ist diejenige Konzentration (in $\mu\text{g/l}$ bzw. $\mu\text{g/kg}$) eines Stoffes, die ein Signal (Peakhöhe) von der doppelten Höhe des Untergrundrauschens erzeugt (WELZ, 1972).

Mit den beschriebenen Verfahren lassen sich Rückstände im Bereich von 1 $\mu\text{g/kg}$ bzw. 1 $\mu\text{g/l}$ mit guter Ausbeute und Wiederholbarkeit nachweisen.

An einem Beispiel soll die Nachweisempfindlichkeit veranschaulicht werden: Zu 5 g Kalbsleber wurden 5 ng Furazolidon (entsprechend 1 $\mu\text{g/kg}$) gegeben und nach dem unter 3.5.2 angegebenen Extraktionsverfahren untersucht. Nach Auflösung des gereinigten Extraktes in 500 μl Methanol-mobiler Phase (1 + 1) und der Injektion von 50 μl in die HPLC-Apparatur wurde vom Schreiber ein Furazolidon-Peak von 8 mm registriert. Diese Peakhöhe entsprach einem Furazolidongehalt von 0,40 ng. Der nach Umrechnung ermittelte Furazolidongehalt von 0,80 $\mu\text{g/kg}$ entspricht dann einer Ausbeute von 80%.

3.6.5 Prüfung der Extrakte (Untersuchung von Kontrollproben)

Zur Überprüfung der Methodik wurden je 20 Muskel-, Leber-, Nieren-, Blut-, Plasma- und Harnproben von geschlachteten Mastschweinen und Kälbern nach den beschriebenen Aufbereitungsverfahren extrahiert und mittels HPLC auf störenden Begleitstoffe untersucht. Die Proben kamen hauptsächlich aus der Staatlichen Versuchsgüterverwaltung Grub bei München und aus bayerischen Betrieben. Nach Angaben der Erzeuger wurden die Tiere nicht mit Furazolidon be-

handelt.

Schon nach Beendigung der Probenaufarbeitung war an Hand des Extraktionsrückstands zu erkennen, daß die Menge an mitextrahierten Begleitstoffen sehr gering war. Dies wurde auch durch die nachfolgende HPLC-Messung bestätigt.

An Hand der Chromatogramme (Abb. 6 - 15) ist gut zu erkennen, daß die Hauptmenge der mitextrahierten Begleitstoffe schon nach ca. drei Minuten von der HPLC-Säule eluiert wurde, während Furazolidon erst nach ca. sieben Minuten auf dem Chromatogramm erschien.

Bei den unbehandelten Proben traten im Bereich des Furazolidonpeaks entweder keine oder kleinere Peaks von wenigen Millimetern Höhe auf. Die durchschnittliche Höhe der Störpeaks lag bei 3 mm. Diese Peakhöhe von 3 mm würde bei den Fleisch- und Organproben (Einwaage: 5 g) einen Furazolidongehalt von ca. 0,2 µg/kg und bei den Blut-, Plasma- und Harnproben (Einwaage: 2 ml) einen Furazolidongehalt von 0,4 µg/l vortäuschen. Von allen Proben enthielten zwei Fleischproben mit Peakhöhen von 10 mm und 8 mm mit Abstand die größten Störpeaks. Die vortäuschten Furazolidongehalte betrugen hier 0,5 µg/kg und 0,4 µg/kg. Die Sicherheitsspanne bis zu 1 µg/kg Furazolidon erscheint deshalb ausreichend.

Die Versuche haben gezeigt, daß man mit den zwei Aufbereitungsverfahren Furazolidongehalte bis zu 1 µg/kg bzw. pro liter in Fleisch-, Leber-, Nieren-, Blut-, Plasma- und Harnproben sicher nachweisen kann.

3.6.6 Störmöglichkeiten durch andere Wirkstoffe

Um Störungen des Furazolidonnachweises durch andere Nitrofurane und Chloramphenicol zu beurteilen, wurden 10 μ l Standardlösung, bestehend aus je 5 ng Nitrofurazon, Nitrofurantoin, Furazolidon und Furaltadon sowie 400 ng Chloramphenicol, in das Probenaufgabeeventil der HPLC-Apparatur (3.1) eingespritzt. Die Wirkstoffe wurden von der Säule mit Hilfe der mobilen Phase Acetatpuffer (pH 4,8)-Acetonitril (70 + 30) bei einer Durchflußrate von 1 ml/min sehr gut getrennt (Tabelle 14). Von den untersuchten Nitrofuranen zeigte Nitrofurazon bei der verwendeten Wellenlänge von 360 nm das größte Peaksignal. Chloramphenicol besitzt bei 275 nm ein Absorptionsmaximum, während Messungen bei einer Wellenlänge von 360 nm zu einem verminderten Signal führten. Um ein Peaksignal von Chloramphenicol zu erreichen, mußte daher eine höhere Konzentration injiziert werden.

Tab. 14: Retentionszeiten von vier Nitrofuranen und Chloramphenicol

Wirkstoff	injizierte Menge (ng)	Peakhöhe (cm)	Retentions- zeit (min)
Nitrofurazon	5	7,5	5,05
Nitrofurantoin	5	6,5	5,13
Furazolidon	5	5,7	7,15
Chloramphenicol	400	3,0	7,50
Furaltadon	5	1,4	11,10

HPLC-Bedingungen

Mobile Phase: Acetatpuffer (pH 4,8)-Acetonitril (70 + 30)

Flußrate von 1 ml/min

Wellenlänge von 360 nm

Detektorempfindlichkeit von 0,01 AUFS

Injektion von 10 μ l Standardlösung

Zur Prüfung der Frage, ob Vitamine unter den beschriebenen HPLC-Bedingungen mit Furazolidon interferieren, wurden verschiedene Vitamine in Reinsubstanz der HPLC-Analyse unterzogen. Die Injektionen von je 2,5 g Vitamin-A-Acetat, Vitamin-A-Palmitat, Thiaminhydrochlorid (Vitamin B₁), Riboflavin (Vitamin B₂), Pyridoxinhydrochlorid (Vitamin B₆) und eines Vitaminkonzentrats, bestehend aus den Vitaminen A, D₃ und E, führten bei einer Wellenlänge von 360 nm entweder zu keinerlei Signalen oder zu einem Signal, das mit Furazolidon nicht interferierte.

3.7 S t a b i l i t ä t v o n F u r a z o l i d o n

3.7.1 L i c h t s t a b i l i t ä t

Furazolidon ist außerordentlich lichtempfindlich. Die Mehrzahl der Untersucher schätzen die Verluste durch Lichtzersetzung des Wirkstoffes bei der Aufarbeitung sehr hoch.

Durch Stehenlassen zweier Furazolidonstandardlösungen (0,1 ng/ μ l und 1 ng/ μ l) auf dem Labortisch bei kontinuierlicher Gehaltsbestimmung wurde versucht, die Veränderungen durch Tageslicht in Chromatogrammen festzuhalten und gegebenenfalls die Verluste zu ermitteln (Abbildungen 16 und 17).

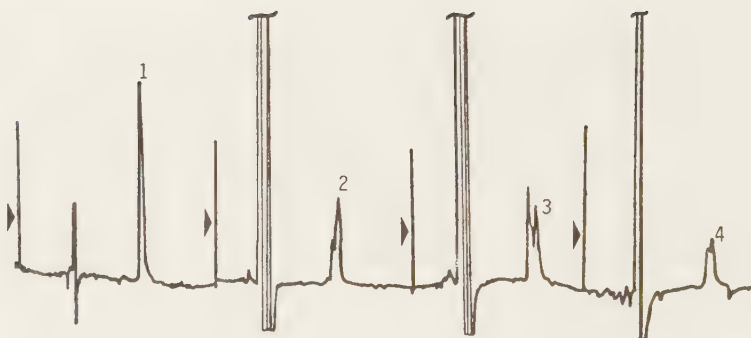


Abb. 16: Chromatogramme einer Furazolidonstandardlösung
(5 ng) nach unterschiedlicher Tageslichtexposition

Zeichenerklärung

1 = Eichlösung, lichtgeschützt

2 = Eichlösung nach 2 Stunden Lichtexposition

3 = Eichlösung nach 3 Stunden Lichtexposition

4 = Eichlösung nach 5 Stunden Lichtexposition

▷ = Injektion (jeweils 50 μ l à 0,1 ng/ μ l)

HPLC-Bedingungen: Wellenlänge von 360 nm

Empfindlichkeit von 0,01 AUFS

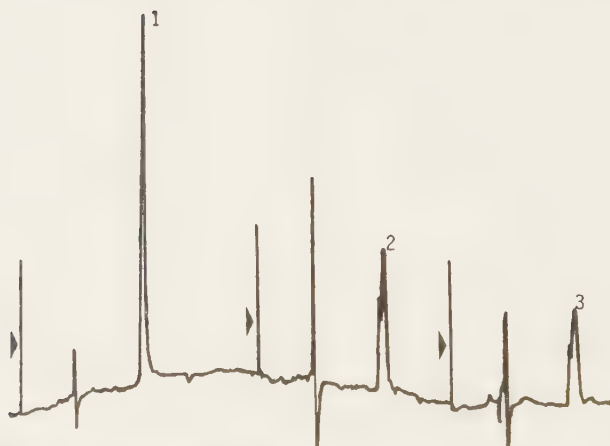


Abb. 17: Chromatogramme einer Furazolidonstandardlösung
(10 ng) nach unterschiedlicher Tageslicht-
exposition

Zeichenerklärung

1 = Eichlösung, lichtgeschützt

2 = Eichlösung nach 2 Stunden Lichtexposition

3 = Eichlösung nach 4 Stunden Lichtexposition

► = Injektion (jeweils 10 μ l à 1 ng/ μ l)

HPLC-Bedingungen: Wellenlänge von 360 nm

Empfindlichkeit von 0,01 AUFS

Der beginnende Abbau von Furazolidon (Abb. 16 und 17) wird durch einen zweiten Peak angezeigt. Eine sichere Identifizierung konnte nicht durchgeführt werden, da Abbauprodukte von Furazolidon nicht zur Verfügung standen. Schon nach zwei Stunden Lichteinwirkung waren 60% und nach fünf Stunden bereits 75% Furazolidon metabolisiert. Verluste dieser Größenordnung wurden gelegentlich an sonnigen Tagen bei der Furazolidonextraktion festgestellt, vor allem wenn die benutzten Glasgefäße versehentlich längere Zeit dem Licht ausgesetzt wurden.

3.7.2 Stabilität von Furazolidon in Blut

Um die Frage zu klären, inwieweit Furazolidon in heparinisiertem Schweineblut im Verlaufe der Zeit inaktiviert wird, wurden zehn Blutproben à 10 ml in heparinisierten (Ammoniumheparinat) Reagenzgläsern mit Furazolidonstandardlösung versetzt (20 ng/ml). Jeweils fünf der Blutproben wurden tiefgefroren (unter -20°C) bzw. bei -3°C aufbewahrt. Um Verluste durch wiederholtes Auftauen zu vermeiden, wurde jede Probe nur einmal analysiert.

Die zugesetzten Furazolidongehalte in den tiefgefrorenen Blutproben blieben auch nach fünf Tagen nahezu un-

verändert. Sie verringerten sich bei der Kühl Lagerung innerhalb von fünf Tagen auf 66,28% (Tabelle 15).

Tab. 15: Abbau von Furazolidon in Blut bei unterschiedlicher Aufbewahrung

Aufbewahrung (Std.)	Furazolidongehalt (%)	
	B l u t	
	tiefgefroren	gekühlt
24	92,75	82,75
48	100,70	77,41
72	93,75	76,39
96	94,60	77,50
120	93,75	66,28

In Blutplasma Proben, die ähnlich wie die Blutproben behandelt und nach der Furazolidonzugabe sofort zur Plasmagewinnung zentrifugiert wurden, waren die ermittelten Furazolidongehalte stets niedriger als bei den Blutproben. Die Ursache dürfte darin liegen, daß bei der Plasmagewinnung ca. 20% des zugesetzten Furazolidons im Blutkörperchen-Anteil verblieb. Auch bei den gekühlten Plasma Proben war der Furazolidonabbau höher als bei den tiefgefrorenen Proben.

4. TIERVERSUCHE

Die Brauchbarkeit des erarbeiteten Extraktions- und Nachweisverfahrens wurde auch durch in-vivo-Versuche überprüft. Dabei sollte vor allem der Frage nachgegangen werden, inwieweit nach oraler Verabreichung von Furazolidon Rückstände in Harn oder Blut nachgewiesen werden können. Damit könnte eine Antwort auf die Möglichkeit einer Kontrolle der Wartezeit für Furazolidon am lebenden Schlachttier gegeben werden. Außerdem sollten Leber, Niere und Fleisch der behandelten Tiere nach Einhaltung der gesetzlich vorgeschriebenen Wartezeit auf Furazolidonrückstände untersucht werden.

4.1 V e r s u c h s t i e r S c h w e i n

4.1.1 Behandlung der Schweine

Um Praxisverhältnisse zu berücksichtigen, wurde bewußt auf die Einzelbehandlung der Schweine verzichtet. Jedem Tier wurden einmal täglich an fünf aufeinanderfolgenden Tagen etwa 10 mg Furazolidon pro kg KGW in Form der Gruppenfütterung oral verabreicht. Das Furazolidon wurde für die beiden Tiergruppen (eine à neun und eine à sechs Tiere) in einem Liter einer 50%igen Zuckerlösung suspendiert, unmittelbar vor der Verabreichung kräftig geschüttelt und einmal täglich auf das Futter im Trog gleichmäßig verteilt. Zur Kontrolle diente eine Gruppe von fünf Tieren.

Die Tiere wurden im Stall bei freier Wasseraufnahme gehalten und zeigten keine Störungen des Allgemeinbefindens. Der Zeitpunkt der Verabreichung und der Probenahme

ist schematisch aufgezeichnet (Abbildung 18).

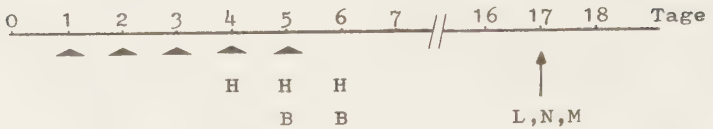


Abb. 18: Zeitpunkt der Verabreichung, Probenahme und Schlachtung

▲ = Verabreichung von Furazolidon

H = Probenahme Harn

B = Probenahme Blut

L, N, M = Probenahme Leber, Niere und Muskel nach der Schlachtung

4.1.2 Furazolidonbestimmung im Schweineharn

Zur Furazolidonbestimmung wurde Spontanharn verwendet. 18 Stunden nach der vierten Behandlung (vierter Tag) wurden fünf Harnproben von den Versuchstieren entnommen. Am Tage der letzten Behandlung (fünfter Tag) wurden 15 Harnproben von den 15 behandelten Tieren gesammelt. Zwischen der 24. und 26. Stunde (sechster Tag) nach der letzten Furazolidonverabreichung wurden fünf weitere Harnproben entnommen.

Einige der Harnproben wurden unmittelbar nach der Probenahme frisch untersucht, die übrigen Proben wurden tiefgefroren und am nächsten Tag untersucht. Die Aufarbeitung erfolgte wie im Kapitel 3.5.4 beschrieben. Zur Absicherung der Ergebnisse wurden einige Proben im Doppelansatz geprüft. Der Umfang der Harnuntersuchungen auf Furazolidon vom fünften und sechsten Tag ist in der Tabelle 16 dargestellt.

Tab. 16: Ausscheidung von Furazolidon mit dem Schweineharn nach oraler Verabreichung (ca. 10 mg/kg KGW/Tier/Tag)

Probe	Zeitpunkt p. appl. (Std.+ Min.)		Furazolidon-Harnspiegel ($\mu\text{g/l}$)
1	0	10	n.n.
2	0	15	11,4
3	0	50	1,4
4	1	05	121,6
5	1	15	27,0
6	1	35	64,9
7	3	00	21,6
8	3	10	735,1
9	3	20	813,5
10	3	30	24,3
11	3	45	1,6
12	5	15	n.n.
13	5	30	n.n.
14	5	50	n.n.
15	6	05	n.n.
16	24	15	n.n.
17	24	40	n.n.
18	25	05	n.n.
19	25	15	n.n.
20	25	30	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar

Nachweisgrenze: $1\mu\text{g/l}$

Bis zu $3\frac{3}{4}$ Stunde nach der letzten Verabreichung konnte Furazolidon im Harn nachgewiesen werden, während die anderen Proben kein Furazolidon in nachweisbarer Konzentration enthielten (Tabelle 16). Auch in den fünf Harnproben, die am vierten Tag, 18 Stunden nach der vierten Behandlung entnommen wurden, konnten keine Furazolidonrückstände nachgewiesen werden. Eine sichere Aussage über den genauen Zeitpunkt der höchsten Furazolidonkonzentration im Schweineharn kann, abhängig vom Versuchsverlauf, nicht gemacht werden. An Hand unserer Daten dürfte der Maximalwert zwischen der zweiten und vierten Stunde p. appl. liegen.

Erwartungsgemäß wurden in den Harnproben der fünf Kontrolltiere Furazolidonrückstände nicht festgestellt.

4.1.3 Furazolidonbestimmung im Schweineblut

Im Zeitraum von 50 Minuten bis zu 24 Stunden nach der fünften oralen Furazolidon-Verabreichung wurden 13 Blutproben von neun Schweinen entnommen und in heparinisierte Monovetten gefüllt. Die anschließende Untersuchung auf Furazolidonrückstände ergab, daß die gereinigten Extrakte bei der HPLC-Messung zu konstanten Peakwertmustern führten. Störungen des Furazolidonnachweises durch mit-extrahierte Begleitstoffe wurden nicht festgestellt. In den neun Blutproben, die innerhalb der ersten drei Stunden nach der oralen Verabreichung entnommen wurden, lagen die Furazolidongehalte zwischen 54 und 890 $\mu\text{g/l}$, während nach einer Wartezeit von 24 Stunden im Blut keine Rückstände nachgewiesen werden konnten (Tabelle 17).

Tab. 17: Furazolidonspiegel von Schweineblut nach oraler
Verabreichung (ca. 10 mg/kg KGW/Tier/Tag)

Tier-Nr.	Zeitpunkt p. appl. (Std.+ Min.)		Furazolidon-Blutspiegel ($\mu\text{g/l}$)
1	0	50	200
2	1	00	54
3	1	10	72
4	1	20	143
5	1	50	324
6	2	20	445
7	2	35	221
8	2	50	890
9	3	20	794
1	24	00	n.n.
2	24	00	n.n.
6	24	00	n.n.
8	24	00	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar

Nachweisgrenze: 1 $\mu\text{g/l}$

4.1.4 Furazolidonbestimmung in Schweineleber, -niere und -muskel nach oraler Verabreichung

Die 15 Schweine der beiden Versuchsgruppen wurden unter Einhaltung der gesetzlich vorgeschriebenen Wartezeit von 17 Tagen nach der letzten Furazolidonverabreichung zusammen mit fünf Kontrolltieren geschlachtet.

Sämtliche Muskel-, Leber- und Nierenproben der 15 behandelten Versuchstiere und der fünf Kontrolltiere wurden nach dem unter Absatz 3.5.2 beschriebenen Aufarbeitungsverfahren auf Furazolidonrückstände untersucht.

In keiner der analysierten 60 Proben wurde Furazolidon nachgewiesen.

4.2 V e r s u c h s t i e r K a l b

4.2.1 Behandlung der Kälber

Das Rückstandsverhalten von Furazolidon wurde nach oraler Verabreichung bei sechs Kälbern untersucht, wobei an zwei aufeinanderfolgenden Tagen einer Gruppe von drei Tieren täglich einmal je 10 mg Furazolidon/kg KGW und einer zweiten Gruppe von drei Tieren täglich einmal je 20 mg Furazolidon/kg KGW jeweils morgens mit der Milchtränke verabreicht wurden. Drei weitere Kälber wurden als Kontrollen verwendet. Sämtliche Tiere wurden im Stall gehalten, einzeln gefüttert und zeigten keine Störungen des Allgemeinbefindens.

4.2.2 Furazolidonbestimmung im Kälberharn

Die erhaltenen Spontanharnproben wurden entweder sofort nach der Probenahme analysiert oder bis zum nächsten Tag bei unter -20°C tiefgefroren und anschließend untersucht.

Die Versuche ergaben, daß mit dem Harn ausgeschiedenes Furazolidon in den ersten Stunden nach dem Absetzen des Furazolidons kontinuierlich zunahm (Tabelle 18 und 19). Nach einer Absetzzeit von 246 Minuten (4,1 Std.) bzw. 618 Minuten (10,3 Std.) wurden bei Dosierungen von 10 mg/kg KGW bzw. 20 mg/kg KGW die höchsten Furazolidonkonzentrationen im Harn mit 2342,9 $\mu\text{g/l}$ und 6428,6 $\mu\text{g/l}$ gemessen. Die Ausscheidung des größten Teils des Furazolidons erfolgte innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem Absetzen. In den Harnproben, die 34 Stunden p. appl. entnommen wurden, konnte kein Furazolidon mehr gefunden werden. In den Harnproben der Kontrollen wurden Furazolidonrückstände nicht festgestellt.

Tab. 18: Ausscheidung von Furazolidon mit dem Harn nach oraler Verabreichung beim Kalb (10 mg/kg KGW/ Tier/Tag)

Zeitpunkt p. appl. (Std.+ Min.)		Furazolidon-Harnspiegel ($\mu\text{g/l}$)		
		Tier-Nr. 43	Tier-Nr. 44	Tier-Nr. 45
0	30	112,0		
1	00		122,4	
3	00		622,9	
3	45		874,3	
4	10			2342,9
4	45	1572,4		
8	30			1911,4
9	30			868,6
9	35	2334,7		
10	45	1971,4		
24	10		n.n.	
25	30		n.n.	
25	40	n.n.		
25	45			14,9
34	00		n.n.	
34	20			n.n.
35	45	n.n.		
36	10		n.n.	

n.n. = nicht nachweisbar

Nachweisgrenze: 1 $\mu\text{g/l}$

Tab. 19: Ausscheidung von Furazolidon mit dem Harn nach oraler Verabreichung beim Kalb (20 mg/kg KGW/Tier/Tag)

Zeitpunkt p. appl. (Std.+ Min.)		Furazolidon-Harnspiegel ($\mu\text{g/l}$)		
		Tier-Nr. 37	Tier-Nr. 38	Tier-Nr. 39
1	10			1000,0
1	30			1011,4
3	10	2071,4		
4	15			2680,0
4	30	1896,0		
8	40			2357,1
10	20			4342,9
10	30			6428,6
24	20		n.n.	
25	05			n.n.
30	00			n.n.
30	45	45,7		
32	00			n.n.
32	40	6,9		
33	10		n.n.	
34	10	n.n.		
35	20	n.n.		
36	15	n.n.		

n.n. = nicht nachweisbar

Nachweisgrenze: 1 $\mu\text{g/l}$

4.2.3 Furazolidonbestimmung im Kälberblut

Relativ hohe Furazolidongehalte wurden in den Blutproben beider Versuchsgruppen bis zur zwölften Stunde nach der letzten Verabreichung festgestellt (Tabelle 20 und 21). Innerhalb von weiteren zwölf Stunden sank der Blutspiegel deutlich ab. Bereits 32 Stunden nach Absetzen des Furazolidons konnten in den Blutproben keine Rückstände mehr nachgewiesen werden.

Typische Chromatogramme von Furazolidon bei der Untersuchung der Blutproben des Kalbes Nr. 38 wurden aufgezeichnet (Abbildung 19).

Tab. 20: Furazolidonspiegel von Kälberblut nach oraler Verabreichung von 10 mg/kg KGW

Zeitpunkt p. appl. (Std.)	Furazolidon-Blutspiegel ($\mu\text{g/l}$)		
	Tier-Nr. 43	Tier-Nr. 44	Tier-Nr. 45
2	514,3		
4		1074,3	
8			934,3
12	445,7	394,3	600,0
16	28,6	14,9	34,3
24	2,9	3,0	4,0
28	n.n.	n.n.	n.n.
32	n.n.	n.n.	n.n.
36	n.n.	n.n.	n.n.
72	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar

Nachweisgrenze: 1 $\mu\text{g/l}$

Tab. 21: Furazolidonspiegel von Kälberblut nach oraler
Verabreichung von 20 mg/kg KGW

Zeitpunkt p. appl. (Std.)	Furazolidon-Blutspiegel ($\mu\text{g/l}$)		
	Tier-Nr. 37	Tier-Nr. 38	Tier-Nr. 39
0,83 (50 min)	582,8		
1	857,1		
2	1268,6		
4		1211,4	
8			1482,9
12	1005,7	1828,6	1142,9
16	400,0	126,9	180,0
24	192,0	2,9	2,5
28	19,4	n.n.	n.n.
32	n.n.	n.n.	n.n.
36	n.n.	n.n.	n.n.
72	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = nicht nachweisbar

Nachweisgrenze: 1 $\mu\text{g/l}$



Abb. 19: Chromatogramm, Furazolidon, Kälberblut

Zeichenerklärung

- 1 = Chromatogramm aus der Blutprobe des Kalbes
Nr. 38 (behandelt mit 20 mg Furazolidon/kg KGW)
16 Std. p. appl.; Einwaage: 1 ml;
Rückstand in 600 μ l gelöst; Injektion: 50 μ l;
Furazolidongehalt: 126,9 μ g/l
- 2 = Kalb Nr. 38, 24 Std. p. appl.; Einwaage: 1 ml;
Rückstand in 200 μ l gelöst; Injektion: 50 μ l;
Furazolidongehalt: 2,9 μ g/l
- 3 = Eichlösung: 5 ng/50 μ l
- 4 = Wiederholung der Analyse: Kalb Nr. 38,
24 Std. p. appl.
- 5 = Kalb Nr. 38, 36 Std. p. appl.
- ↓ = Injektion

HPLC-Bedingungen: Wellenlänge von 360 nm,
Detektorempfindlichkeit
von 0,01 AUFS

4.2.4 Furazolidon in Leber, Niere und Muskel vom Kalb
nach oraler Verabreichung von 10 bzw. 20 mg
Furazolidon/kg KGW

17 Tage nach der letzten Verabreichung von Furazolidon wurden die Mastkälber der beiden Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe geschlachtet. Nach der Entnahme der Leber-, Nieren- und Muskelproben erfolgte die Aufarbeitung der Proben nach dem beschriebenen Analyseverfahren (3.5.2).

In keiner der untersuchten Proben konnten bei einer Nachweisgrenze von 1 $\mu\text{g/kg}$ Furazolidonrückstände ermittelt werden. Die 17tägige Absetzfrist entspricht der amtlich festgesetzten Wartezeit für Furazolidon.

IV. DISKUSSION

Die HPLC hat in zunehmendem Maße in die Lebensmittelüberwachung Eingang gefunden und bietet auch beim Erfassen von Furazolidonrückständen große Möglichkeiten. Wesentliche Vorteile der HPLC-Bestimmung von Furazolidon gegenüber den bisher angewendeten photometrischen Bestimmungsmethoden liegen in der Einsparung von Vorreinigungsschritten bei der Probenaufarbeitung, in der Verkürzung der Analysenzeit, in der Erkennung ähnlich strukturierter Verbindungen bzw. Metaboliten, in einer exakteren quantitativen Bestimmung und in einer höheren Nachweisempfindlichkeit (SCHWEIGHARDT und LEIBETSEDER, 1979; BUCHER et al., 1981; PETZ 1982 a und 1983 a).

Zur HPLC-Bestimmung von Furazolidon wurden bisher überwiegend Trennsäulen mit den Reversed-Phase-Säulenmaterialien μ Bondapak C-18 (CIERI, 1979), LiChrosorb RP-18 (SCHWEIGHARDT und LEIBETSEDER, 1979), Ultrasphere-ODS (WINTERLIN et al., 1981), Partisil PXS 10/25 ODS (VEALE et al., 1982), Zorbax CN (PETZ, 1982 a) und MOS-Hypersil (PETZ, 1983 a) eingesetzt. Eine sehr gute Trennleistung wurde bei den eigenen Versuchen mit einer 25 cm langen Trennsäule, gefüllt mit dem Reversed-Phase-Material Spherisorb ODS, Korngröße 5 μ m, erzielt. Zur Elution von Furazolidon wurden bisher meist entweder Methanol-Wasser-Gemische oder Acetonitril-Wasser-Gemische verwendet. Von den getesteten Elutionsgemischen erwies sich ein von PETZ (1982 a) eingesetztes Acetatpuffer (pH 5,0)-Acetonitril-Gemisch als geeignet. Eine optimale Elution wurde mit einem modifizierten Acetatpuffer 0,01 mol/l (pH 4,8)-Acetonitril-Gemisch im Verhältnis 70 + 30 erreicht.

Zum Schutz der Trennsäule vor Verunreinigungen und zur Erhaltung einer guten Trennleistung wurde als weitere Verbesserung vor der Trennsäule eine Vorsäule von 6 cm

Länge eingebaut, die Perisorb RP-18, Korngröße 30-40 μm , enthielt. Bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 1 ml/min und der UV-Detektion bei 360 nm gelang es, mit der beschriebenen HPLC-Apparatur noch 0,2 ng Furazolidon (Rein-substanz) zu erfassen. Die UV-Detektion ist demzufolge für den Nachweis von Furazolidon in Proben nach entsprechender Probenaufarbeitung als sehr empfindlich anzusehen.

Als Grundlage für die Aufarbeitung von Leber-, Nieren- und Fleischproben diente ein von WINTERLIN et al. (1981) beschriebenes Extraktions- und Reinigungsverfahren. Zur Vermeidung von Emulsionen wurden die Ausschüttelungen n-Hexan gegen Essigsäure 0,01 mol/l und Essigsäure 0,01 mol/l gegen Dichlormethan nicht in Scheidetrichtern durchgeführt. Die Emulgation der Lösungen in Reagenzgläsern mittels Reagenzglasschüttler und anschließender Zentrifugation hatte nicht nur eine bessere Phasentrennung, sondern auch reinere Extrakte und höhere Furazolidonausbeuten zur Folge. Furazolidonzusätze von jeweils 1, 5 und 20 $\mu\text{g/kg}$ zu Muskel-, Leber- und Nierenproben von unbehandelten Mastkälbern und Mastschweinen wurden im Durchschnitt zu 70,4 - 90,7% wiedergefunden. Die ermittelten Ausbeuten sind aufgrund der Labilität und Lichtempfindlichkeit von Furazolidon als sehr gut anzusehen. Bei neueren Untersuchungen über Furazolidonrückstände in Putengeweiben mit HPLC wurden Ausbeuten zwischen 80 und 95% erreicht (WINTERLIN et al., 1981 und 1982; PETZ, 1983 a). SUGDEN et al. (1983) erzielten für Furazolidon Wiederfindungsraten von 73,5%. Mit dem verwendeten UV-Detektor konnte eine Nachweisempfindlichkeit für Furazolidongehalte in Organ- und Muskelproben bis unterhalb von 1 $\mu\text{g/kg}$ erreicht werden.

Für die Aufarbeitung von Blut- und Plasmaproben war das für Muskel- und Organproben eingesetzte Extraktionsmittel Dichlormethan infolge zu starker Emulsionsbildung wenig geeignet. Die Extraktion von Furazolidon erfolgte hier mit Ethylacetat, das bereits von VEALE und HARRINGTON (1982) zur Aufarbeitung von Schweineplasma benutzt worden war. Die weiteren Arbeitsschritte wurden nicht übernommen. Durch Lösen des eingeeengten Extraktes in einem Methanol-HPLC-Fließmittel-Gemisch (1 + 1) und durch Entfernung von mitgeschleppten Lipiden mittels n-Hexan konnten reinere Extraktlösungen für die HPLC-Analyse erhalten werden. Die Ausbeuten für Furazolidon lagen für heparinisiertes Schweine- und Kälberblut bei durchschnittlich 73,6 - 88,9%.

Das für Blut- und Plasmaproben beschriebene Verfahren konnte mit zwei Abänderungen zur Bestimmung von Furazolidon in Harnproben verwendet werden. Da die Extraktion von Furazolidon sehr stark vom pH-Wert der Probe abhängt, mußten die Harnproben vor der Extraktion aufgrund ihrer unterschiedlichen Azidität auf einen einheitlichen pH-Wert von 7,5 eingestellt werden. Zum anderen wurde infolge der Reinheit der Extrakte auf eine Ausschüttlung mit n-Hexan zur Entfernung von eventuell vorhandenen Störsubstanzen verzichtet. Furazolidonzusätze von 1, 5 und 20 $\mu\text{g/l}$ zu Kälberharn sowie von 5 und 20 $\mu\text{g/l}$ zu Schweineharn wurden durchschnittlich zu 76,2 - 83,3% wiedergefunden. Lediglich bei Zusätzen von 1 $\mu\text{g/l}$ Furazolidon zu Schweineharn betrug die durchschnittliche Wiederfindungsrate nur 54,8%.

Mit der beschriebenen Methodik lassen sich Furazolidonrückstände in Fleisch-, Leber-, Nieren-, Blut-, Plasma- und Harnproben von Kalb und Schwein bis 1 $\mu\text{g/kg}$ bzw. 1 $\mu\text{g/l}$ nachweisen. Störungen durch andere Nitrofurane sind bei der HPLC-Bestimmung aufgrund der unterschiedlichen Retentionszeiten der Wirkstoffe nicht zu erwarten.

Analysen von Furazolidon müssen rasch und unter Lichtschutz durchgeführt werden. Bei den eigenen Untersuchungen betrug die Inaktivierung einer dem Tageslicht ausgesetzten Furazolidon-Standardlösung nach zwei Stunden 60% und fünf Stunden 75%. Während SUGDEN et al. (1983) den Aktivitätsverlust mit nur ca. 1% pro Stunde angaben, ermittelte PETZ (1982 a) nach vier Stunden Tageslichtexposition bereits einen Verlust von 50 bis 60%, der den eigenen Ergebnissen etwa entspricht.

Stabilitätsuntersuchungen von Furazolidon im Schweineblut ergaben, daß in Furazolidon-haltigen tiefgefrorenen Blutproben (20 µg/l) selbst nach fünf Tagen kein signifikanter Abbau der Substanz festgestellt werden konnte, während nach fünf Tagen Kühlagerung die Furazolidongehalte in den Blutproben auf 66,28% absanken. In einem ähnlichen Versuch ermittelten VEALE und HARRINGTON (1982) eine mit den eigenen Ergebnissen vergleichbare tägliche Furazolidonabnahme von ca. 10% bei kühl gelagerten Blutplasmaproben. PETZ (1982 a) berichtete über einen außerordentlich raschen Abbau von Nitrofuranen in Muskelgewebe. Zusätze von fünf Nitrofuranen zu Schweinefleisch (jeweils 1 mg/kg) waren bereits nach sechs Stunden bis auf 1 - 19% des ursprünglichen Gehalts abgesunken.

Furazolidon wurde im Harn von Schwein und Kalb insgesamt relativ schnell ausgeschieden. Unterschiede zeigten sich jedoch in der Verweildauer von Furazolidon im Harn. Während beim Schwein bereits nach etwa fünf Stunden Furazolidon nicht mehr nachgewiesen werden konnte, lag dieser Zeitpunkt für das Kalb bei 34 Stunden. Tierartliche Unterschiede in der renalen Exkretion von Nitrofuran-Derivaten wurden auch von PAUL et al. (1960) betont.

Wegen zeitlicher Lücken in der Probenahme beim Schwein (zwischen der 3. und 24. Stunde post applicationem)

lassen sich die Furazolidon-Blutspiegel der beiden Tierarten nicht so gut vergleichen. Überraschend war bei den Kälbern der starke Blutspiegelabfall zwischen der 12. und 16. Stunde p. appl. bei beiden Dosierungen. MÜLLING et al. (1971) und PIETSCH et al. (1978) berichteten ebenfalls über einen auffälligen schnellen Abfall der Furazolidonkonzentration im Kälberblut. Die von PIETSCH et al. (1978) bereits zwei Stunden p. appl. beobachteten maximalen Blutspiegel sind ein nicht bestätigter Befund. Beide Arbeitsgruppen konnten 24 Stunden p. appl. keine Furazolidonblutspiegel ermitteln. Nur eine geringfügig längere Verweildauer von Furazolidon im Blut wurde bei den eigenen Untersuchungen beobachtet.

Die Ergebnisse der Furazolidonbestimmung in Leber, Niere und Muskel von Schwein und Kalb, die nach Einhaltung der gesetzlich vorgeschriebenen Wartezeit von 17 Tagen geschlachtet wurden, waren insofern eindeutig, als in keiner der analysierten Proben Furazolidonrückstände festgestellt werden konnten. In den wenigen entsprechenden Versuchen beim Geflügel konnten bereits 24 Stunden p. appl. keine Furazolidonrückstände mehr in den untersuchten Geweben festgestellt werden (WINTERLIN et al., 1982; SUGDEN et al., 1983). Lediglich PETZ (1984) ermittelte in Hühnereiern fünf bis sechs Tage nach dem Absetzen des Furazolidon-haltigen Futters (400 mg/kg) Gehalte im Bereich der Bestimmungsgrenze von 10 $\mu\text{g/kg}$. Zwei Tage nach Absetzen der Furazolidonbehandlung bei Masthühnern und Legehennen im Blut und in den Organen fanden KRIEG und LÖLIGER (1973) keinen Wirkstoff mehr.

Die rasche Metabolisierung und Eliminierung von Furazolidon im Tierkörper erlauben keine Überwachung der langen Wartezeit für die Arzneimittel durch Untersuchung von Blut oder Harn beim lebenden Schlachttier.

V. Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Eine hochdruckflüssigkeitschromatographische Methode zum Nachweis von Furazolidon-Rückständen in Muskulatur, Leber und Niere sowie im Blut und Harn von Kalb und Schwein wurde unter Berücksichtigung bekannter HPLC-Methoden erarbeitet und in Ausscheidungsversuchen bei Kalb und Schwein eingesetzt. Die Erfassungsgrenze der Methode betrug $1 \mu\text{g/kg}$ Körpergewebe bzw. $1 \mu\text{g/l}$ Körperflüssigkeit. Die Wiederfindungsraten von Furazolidon lagen bei den Konzentrationen von 1, 5 und $20 \mu\text{g/kg}$ bzw. $\mu\text{g/l}$ zwischen 70,4 und 90,7%. Die Wiederholbarkeit der Meßergebnisse war zufriedenstellend.
2. Die gegenüber anderen entsprechenden HPLC-Methoden verbesserte Empfindlichkeit wurde dadurch erreicht, daß eine Trennsäule, gefüllt mit dem Reversed-Phase-Material Spherisorb ODS, Korngröße $5 \mu\text{m}$, verwendet wurde. Eine Vorsäule von 6 cm, gefüllt mit Perisorb RP-18 sorgte u.a. für die Erhaltung einer guten Trennleistung. Die optimale Elution von Furazolidon erfolgte mit einem Acetatpuffer 0,01 mol/l (pH 4,8)-Acetonitril-Gemisch im Verhältnis 70 + 30. Durch die Einstellung des UV-Detektors auf die Wellenlänge von 360 nm wurden im Chromatogramm ausgezeichnete Signale erzielt. Im Bereich der Retentionszeit von Furazolidon wurden keine störenden Peaks beobachtet.

Eine Vereinfachung der Methode wurde durch Emulgation der Lösungen im Reagenzglas mittels Schüttelgerät und durch anschließendes Zentrifugieren anstelle von Scheidetrichtern erreicht. Bessere Phasentrennung, reinere Extrakte, höhere Furazolidonausbeuten und Material- und Zeitersparnis waren die Folge. Innerhalb einer Stunde konnten sechs Gewebe- bzw. zwölf Blut- oder Harnproben untersucht werden.

3. Furazolidon wurde 15 Schweinen und sechs Kälbern oral verabreicht. Es erfolgten Bestimmungen der Blut- und Harnspiegel während und nach der Behandlung. Muskel, Leber und Niere wurden nach Ablauf der Wartezeit auf Rückstände untersucht. Nach einmal täglicher oraler Verabreichung von Furazolidon in einer Dosis von 10 bzw. 20 mg/kg KGW für zwei Tage an je drei Mastkälber konnte Furazolidon nach 32 Stunden p. appl. nicht mehr im Blut und nach 34 Stunden p. appl. nicht mehr im Harn nachgewiesen werden.

15 Schweinen wurden einmal täglich über fünf Tage 10 mg Furazolidon/kg KGW oral verabreicht. Im Harn konnte Furazolidon bereits nach etwa fünf Stunden p. appl. nicht mehr nachgewiesen werden. Auf tierartliche Unterschiede in der renalen Ausscheidung bei Schwein und Kalb wurde hingewiesen.

Nach Ablauf der Wartezeit von 17 Tagen wurden in keiner der untersuchten Muskel-, Leber- und Nierenproben von Kalb und Schwein Furazolidonrückstände gefunden.

4. Nach zwei bzw. fünf Stunden Tageslichteinwirkung war die Aktivität einer Furazolidon-Standardlösung um 60% bzw. 75% vermindert. Im tiefgefrorenen Blut ließ sich Furazolidon fünf Tage lang ohne Verlust aufbewahren. Die Aktivität von Furazolidon im gekühlten Blut sank nach fünf Tagen auf 66,28% der ursprünglichen Konzentration.

V. S U M M A R Y

DETERMINATION OF FURAZOLIDONE-RESIDUES
IN BODY TISSUES AND BIOLOGICAL FLUIDS OF CALF AND SWINE
BY HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY

1. A high pressure liquid chromatographic procedure was developed to detect furazolidone residues in muscles, livers and kidneys as well as in blood and urine of calves and swine. This procedure, which takes known HPLC methods into consideration, was used to study elimination in calves and swine. The method's limit of detectability was 1 $\mu\text{g/kg}$ body tissue and 1 $\mu\text{g/l}$ body liquid. The furazolidone recovery rates for concentrations of 1, 5 and 20 $\mu\text{g/kg}$ or $\mu\text{g/l}$ ranged from 70.4 to 90.7%. The reproducibility of the results was satisfactory.
 2. The improved sensitivity compared to other corresponding HPLC methods was achieved by using a chromatographic column filled with Spherisorb ODS, a reversed phase material with a particle size of 5 μm . A guard column measuring 6 cm was filled with Perisorb RP 18 to ensure that a good efficiency of separation was maintained. Optimum furazolidone elution was achieved with a mixture of 0.01 M acetate buffer (pH 4.8) and acetonitrile in a ratio of 70:30. Excellent signals were obtained in the chromatogram by setting the UV detector to a wave length of 360 nm. No disturbing peaks were observed within furazolidone's retention time.
- The method was simplified by emulsifying the solutions in the test tube with a vibrator; this was followed by centrifugation, rather than separation with funnels.

Improved phase separation, purer extracts, higher furazolidone recovery and savings of time and material resulted. Six tissue samples or 12 blood or urine samples could be studied in one hour.

3. Furazolidone was administered orally to 15 swine and six calves. Blood and urine concentrations were determined during and following treatment. After the waiting period had elapsed, the muscles, livers and kidneys were checked for residues. Following the oral administration of furazolidone once daily in doses of 10 and 20 mg/kg body weight for two days to three fattened calves each, furazolidone could no longer be detected in the blood and urine 32 and 34 hours p. appl., respectively.

Fifteen swine were given 10 mg furazolidone/kg body weight orally once daily for five days. After only approximately five hours p. appl., furazolidone could no longer be detected in the urine. Mention has been made of differences between swine and calves with respect to renal elimination. After the 17-day waiting period had elapsed, no furazolidone residues were found in any of the muscle, liver and kidney samples studied from calves and swine.

4. The activity of a standard furazolidone solution was reduced by approximately 60 and 75% after being subjected to daylight for two and five hours, respectively. Furazolidone could be kept for five days in frozen blood without any loss. Furazolidone's activity fell in refrigerated blood to 66,28% of its original concentration after five days.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- ALI, B.H. (1980) Inhibition of monoamine
BARTLET, A.L. oxidase by furazolidone in
the chicken and the influence
of the alimentary flora
thereon.
Br. J. Pharmac. 71, 219-224
- ALI, B.H. (1981) Some actions of furazoli-
BARTLET, A.L. done in poultry.
Br. J. Pharmac. 72, 555-557
- ARTEM'EVA, S.A. (1964) Dynamics of the distribution
of furazolidone in the body.
Mater XIII nauch. Konf. Le-
ningrad. vet. Inst. S. 76-77
Ref. in: Vet. Bull. 35, 237
(1965)
- AUFRÈRE, M.B. (1977) High performance liquid chro-
HOENER, B. matographic assay for nitro-
VORE, M. furantoin in plasma and urine.
Clin. Chem. 23, 2207-2212
- AUFRÈRE, M.B. (1978) Isolation and identification
HOENER, B. of the major metabolite of
D'ANGONA, J.L. nitrofurantoin.
VORE, M. Toxic. appl. Pharmac. 45, 238
- BARTOS, J. (1975) Resistance to chlortetracy-
LEBDUSKA, J. cline, streptomycin and fu-
razolidone of Escherichia
coli strains isolated from
laying hens in producing and
breeding flocks.
Docum. vet., Brno 8, 193-203

- BARTOS, J.
POLAKOVA, M.
LEBDUSKA, J.
- (1972) Die Wirksamkeit der Kombination Chloramphenicol, Sulfadimidin, Furazolidon und ihrer Komponenten bei Gastroenteritiden neugeborener Kälber. Vet. Med. Praha 17, 149-158
- BAUR, J.
- (1983) Persönliche Mitteilung.
Hydro-Chemie GmbH, München
- BENDER, R.C.
PAUL, H.E.
- (1951) Metabolism of the nitrofurans. III. Studies with xanthine oxidase in vitro. J. biol. Chem. 191, 217-222
- BENTZ, H.
- (1982) Veterinärmedizinische Pharmakologie.
VEB Gustav Fischer, Jena
- BESSARABOV, B.F.
RODIN, J.V.
SUMILOVA, J.N.
- (1973) Wirkung einiger Präparate gegen Escherichia coli. Veterinariya, Moskva 8, 47
- BILIC, V.
ZUTIC, M.
- (1979) Sensitivity of Escherichia coli strains isolated from swine. Vet. Glasn. (Beograd) 23, 131
- BONELLI, E.
- (1965) Pesticide Residue Analysis Handbook. Wilkens Instr. & Research, Inc. Walnut Creek, California
- BORLAND, E.D.
- (1979) An incident of suspected furazolidone toxicity in pigs. Vet. Rec. 105, 169

- BREINLICH, J. (1964) Zur Analytik arzneilich ge-
brauchter Nitrofurane und
des Metronidazols.
Dt. Apotheker-Zeitung 104,
535-540
- BRYAN, G.T. (1978) Occurence, production and
uses of nitrofurans. p. 1-12
In: "Carcinogenesis, a com-
prehensive survey". Vol. 4,
Nitrofurans (Bryan, G.T. ed.).
Raven Press, New-York.
- BUCHER, E. (1981) Quantitative Bestimmung von
Furazolidon in Mischfuttern
mittels HPLC.
Sonderdruck aus "Landwirtsch.
Forsch." 24, 174-181
Bayer. Landesanstalt für Bo-
denkultur und Pflanzenbau.
- WANKE, E.
- LEPSCHY, J.
- BUITKAMP, B. (1978) Untersuchung über die Empfind-
lichkeit von Mycoplasma hyorhi-
nis-Stämmen gegenüber verschie-
denen Antibiotika und Nitrofu-
razon.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr.
21, 253-256
- HEITMANN, J.
- KIRCHHOFF, H.
- BUZARD, J.A. (1962) Studi sulla distribuzione
metabolismo e meccanismo
d'azione dei nitrofurani.
Giorn. ital. Chemioter. 5-9,
1-12
- BUZARD, J.A.
- VRABLIC, D.M.
- PAUL, M.F. (1956) Colorimetric determination
of nitrofurantoin and fura-
zolidone in plasma.
Antibiotics and Chemotherapy
(New-York) 6, 702-706

- BUZARD, J.A.
CONKLIN, J.D.
O'KEEFE, E.
PAUL, M.F.
- (1961) Studies on the absorption, distribution and elimination of nitrofurantoin in the rat. J. Pharmc. exp. Ther. 131, 38-43
- CIERI, Z.R.
- (1979) High pressure liquid chromatographic detection and estimation of furazolidone and nitrofurazone in animal feeds. J.Ass. off. analyt. Chem. 62, 168
- COHEN, S.M.
- (1978) Toxicity and carcinogenicity of nitrofurans. p. 171-231 In: "Carcinogenesis, a comprehensive survey". Vol. 4. Nitrofurans (Bryan, G.T. ed.). Raven Press, New-York.
- COHEN, S.M.
LOWER, G.M.
ERTÜRK, E.
BRYAN, G.T.
- (1973) Comparative carcinogenicity in swiss mice of n-(4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl) acetamide and structurally related 5-nitrofurans and 4-nitrobenzenes. Cancer Research 33, 1593
- CONKLIN, J.D.
HOLLIFIELD, R.D.
- (1965) A new method for the determination of nitrofurantoin in urine. Clin. Chem. 11, 925
- COX, P.L.
HEOTIS, J.P.
- (1962) J. agric. Fd. Chem. 12, 402
zitiert nach STONE

- CRAINE, E.M. (1972) Metabolites of furazolidone
RAY, W.H. in urine of chickens.
J. Pharmac. Sci. 61, 1495
- CZARNECKI, C.M. (1980) A morphometric study of
GRAHN, D.A. myocardial mitochondria and
myofibrils in turkey poult
during development of furazolidone-induced cardiomyopathy.
Avian Dis. 24, 955-970
- CZARNECKI, C.M. (1980) Effects of furazolidone in
SUJARIT, V.K. the early chick embryo.
Poult. Sci. 58, 988-990
- DANN, O. (1947) Bakteriostatisch wirkende
MÖLLER, E.F. Nitro-Verbindungen des Thio-
phens und Furans.
Chem. Ber. 80, 23-36
- DAVIS, J.W. (1961) Studies on swine dysentery.
J. Am. vet. med. Ass. 138,
471-483
- DEVRIESE, L.A. (1975) Furazolidone sensitivity
test with Escherichia coli
and Staphylococcus aureus
strains of animal origin.
Zbl. VetMed. B. 22, 220
- DIRKSEN, G. (1974) Neuere Gesundheitsprobleme
HOFMANN, W. bei Aufzucht und Mast von
Kälbern, eine Übersicht.
Vet.-med. Nachr. 1, 3-21

- DOCAMPO, R.
MORENO, S.N.J.
STOPPANI, A.O.M.
(1981) Nitrofurantoin enhancement of
microsomal electron trans-
port, superoxide anion pro-
duction and lipid peroxida-
tion.
Archs Biochem. Biophys. 207,
316-324
- DODD, M.C.
STILLMAN, W.B.
(1944) The in vitro bacteriostatic
action of some simple furan
derivatives.
J. Pharmac. exp. Ther. 82,
11-18
- EBEL, S.
LIEDTKE, R.
MISSLER, B.
(1980) Quantitative Bestimmung von
Nitrofurantoin in Körper-
flüssigkeiten durch HPLC
mit Direkinjektion.
Arch. Pharm. (Weinheim) 313
95-96
- EBEL, S.
LIEDTKE, R.
MISSLER, B.
RICHTER, M.
SURMANN, P.
(1979) Quantitative Bestimmung von
Nitrofurantoin im Urin.
Arch. Pharm. (Weinheim) 312
689- 696
- EHRHARD, G.
RUSCHING, E.
(1972) Aus: "Arzneimittel 4"
Verlag: Chemie,
Weinheim/Bergstraße
- ERNST, G.F.
KAADEN, VAN DER, A.
(1980) High performance liquid chro-
matographic analysis of fu-
razolidone in liver and
kidney.
J. Chromat. 198, 526-528

- ERTÜRK, E. (1971) Comparative carcinogenicity
MORRIS, J.E. of formic acid 2-(4-(5-ni-
COHEN, S.M. tro-2-furyl)-2-thiazolyl)
ESCH, VON, A.M. hydrazide and related chemi-
CROVETTI, A.J. cals in the rat.
BRYAN, G.T. J. natn. Cancer Inst. 47,
437-445
- FANKHAUSER, J.A. (1981) Nitrofurazone toxicity in
BIEN, B. dairy calves.
COTTINGHAM, R. Vet. Med. small Anim. Clin.
76, 861-862
- FISHER, E.W. (1971) Antibiotics and calf diar-
FUENTE, DE LA, G.T. rhoea - the effect of serum
immune globulin concentra-
tions.
Vet. Rec. 89, 579-582
- FRAHM, L. (1975) Gas-liquid chromatographic
GEORGE, G.M. determination of nifursol
MCDONNELL, J.P. in frozen turkey tissues
to ten parts per billion.
J. Ass. off. analyt. Chem.
58, 694
- GANG, D.M. (1972) Turbidimetric method for as-
SHAIKH, K.Z. say of nitrofurane compounds.
J. Pharmac. Sci. 61, 462
- GEDEK, W. (1976) Mikrobiologischer Nachweis
WEBER, U. von Nifurprazine in Kör-
TERPLAN, G. perflüssigkeiten und -ge-
weben vom Rind.
Zbl. VetMed. 23, 346-349
- GILMAN, H. (1930) Nitrofurfural and nitrofuryl-
WRIGHT, G.F. acryl acid.
J. Am. Chem. Soc. 52, 2550-2554

- GLAWISCHNIG, E.
BAUMGARTNER, W. (1973) Hämorrhagische Diathesen bei Kälbern als Folge längerwährender Furazolidon-Beifütterung.
Wien. tierärztl. Mschr. 60, 210-213
- GLINSKI, Z.
KOWALSKA, M. (1976) Wirkung einiger Nitrofurane im Honig und Honigbienen gefüttertem Zuckersirup.
(Deutsche Zusammenfassung)
Medycyna wet. Warszawa 32, 164-167
- GOEL, S.K.
SINGH, R.P. (1971) Effect of nitrofurazone feeding on dogs and donkeys experimentally infected with Trypanosoma evansi.
J. Research (Haryana) 8, 534-536
Ref. in: Vet. Bull. 42, 779
- GRISK, A. (1967) Zur Pharmakodynamik von Nitrofuranen.
Arch. exp. VetMed. 21, 243-257
- GYLSTORFF, I. (1978) Rückstände in Geflügelfleisch und Eiern nach Verwendung von Kokzidiostatika und Anthelmintika.
In: "Rückstände in Geflügelfleisch und Eiern". Dt. Forschungsgemeinschaft, Bonn

- GYLSTORFF, I. (1956) Behandlungsversuche mit
DORN, P. Furoxon bei experimenteller
B. pullorum-Infektion von
Küken und mit Nitrofurazon
bei experimenteller Blind-
darmkokzidiose (*E. tenella*).
Arch. Geflügelk. Heft 3/4,
107-118
- HABRDA, J. (1977) Therapeutic efficacy of re-
MALIKOVA, M. duced doses of neomycin, fu-
BARTOS, J. razolidone, and a combination
of them in calf diarrhoea.
(Englische Zusammenfassung)
Vet. Med. Praha 22, 91-98
- HARTMAN, E.G. (1981) Mycoplasma bovis mastitis in
GROOTENHUIS, G. a dairy herd in the Nether-
WERDLER, M. lands.
(Englische Zusammenfassung)
Tijdschr. Diergeneesk. 106,
3-8
- HENNINGSON, R.W. (1961) Furacin residues in milk.
J. Dairy Sci. 44, 175-176
- HENNINGSON, R.W. (1963) Effect of intrauterine in-
HURST, V. fusion of penicillin, strep-
MOOR, S.L. tomycin and vaginal deposi-
KELLY, J.W. tion of furacin on chemical
residue levels in milk.
J. Dairy Sci. 46, 195-196

- HEOTIS, P.J. (1980) Specific programmed multiple development-thin layer chromatography of furazolidone in chicken, turkey, swine and bovine tissues. Collaborative study. J. Ass. off. analyt. Chem. 63, 720-726
- MERTZ, J.L.
- HERRETT, R.J.
- DIAZ, J.R.
- HART, VAN, D.C.
- OLIVARD, J.
- HERRETT, R. (1960) Determination of furazolidone and nitrofurazone in chicken tissues. Analytical Chem. 32, 1676-78
- BUZARD, J.A.
- HOENER, B. (1979) High pressure liquid chromatographic determination of furazolidone in turkey tissue. J. Ass. off. analyt. Chem. 62, 257-261
- LEE, G.
- LUNDERGAN, W.
- HOFFMANN-FEZER, G. (1974) Untersuchungen über die chronische Furazolidonvergiftung beim Kalb. 2. Mitteilung: Verlaufsuntersuchungen am Knochenmark. Dt. tierärztl. Wschr. 81, 59-63
- HOFFMANN, R.
- HOFMANN, W.
- HOFMANN, W. (1972) Hämorrhagische Diathese beim Kalb infolge chronischer Furazolidon-Vergiftung. Dt. tierärztl. Wschr. 79, 289-292

- HOFMANN, W. (1974) Untersuchungen über die chronische Furazolidonvergiftung beim Kalb.
HOFFMANN, R. 1. Mitteilung: Klinische, hämatologische und morphologische Untersuchungen.
HOFFMANN-FEZER, G. Dt. tierärztl. Wschr. 81, 53-58
- HOFMANN, W. (1977) Neuere Untersuchungen über die Verträglichkeit von Furazolidon bei Kälbern.
THIEL, W. Dt. tierärztl. Wschr. 84, 1-7
REINACHER, M.
DIRKSEN, G.
- HOLLIFIELD, R.D. (1968) Method specific for determination of furazolidone in urine. Evidence for drug-related metabolites.
CONKLIN, J.D. J. Pharmac. Sci. 57, 325-328
- IVANOVA, P.S. (1966) Behandlung und Chemoprophylaxe der Ferkelkokzidiose (russisch).
MANDRUSOV, A.F. Veterinariya, Moskwa 43, 49
- JONES, A.D. (1978) Determination of furazolidone in pigs and poultry feeds by high performance liquid chromatography.
SMITH, E.C. Analyst 103, 1262-1266
SELLINGS, S.G.
BURNS, I.W.
- KLEMENCIC, J.M. (1978) Mutagenicity of nitrofurans.
WANG, C.Y. In: "Carcinogenesis, a comprehensive survey". Vol. 4, Nitrofurans (Bryan, G.T. ed.). p. 99-130, Raven Press, N.Y.

KNIVETT, V.A.
TUCKER, J.F.

- (1972) Comparison of oral vaccination or furazolidone prophylaxis for Salmonella typhimurium infection in chicks.
Br. vet. J. 128, 24-34

KRIEG, R.

- (1972) Der Übergang von Furazolidon in das Ei bei therapeutischer Anwendung.
Arch. Geflügelk. 36, 171-174

KRIEG, R.
LÖLIGER, H.C.

- (1973) Nachweis von Furazolidon in Blut und Geweben bei Masthühnern und Legehennen nach therapeutischer Anwendung.
Arch. Geflügelk. 37, 93-97

KUEMMERLE, H.P.

- (1971) Klinische Pharmakologie und Pharmakotherapie.
Urban & Schwarzenberg-Verlag, Wien

LILJA, C.-G.

- (1975) Furazolidone poisoning in calves.
Sven. Veterinärtidning 27, 699-702

LÜDERS, H.
HINZ, K.-H-

- (1978) Zur Frage der Rückstandsbildung von Sulfonamiden und Nitrofuranen beim Geflügel nach therapeutischer Verabreichung.
In: "Rückstände in Geflügelfleisch und Eiern". Dt. Forschungsgemeinschaft, Bonn

- LUENGYOSLUECHAKUL, S. (1983) Untersuchung zur Verträglichkeit von Furazolidon beim Schwein.
Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- MACHEREY-NAGEL (1982) HPLC - Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
Firmenschrift Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
- MANUEL, M.F.
TROVELA, E. (1977) Further studies on the prophylactic value of halofuginone and furazolidone against Leucocytozoonosis in chickens under field conditions.
Philipp. J. vet. Med. 16, 31-39
- MARTIN, J.E. (1958) Characteristics and uses of the nitrofurans in veterinary medicine.
MSU. Vet. (East Lansing) 19, 95-101
- MATZKE, P.
GEDEK, W. (1975) Ergebnisse des Hemmstofftests bei Mastkälbern nach Behandlung mit antibakteriell wirksamen Arzneimitteln.
Prakt. Tierarzt 56, 478-482
- MAURER, H. (1978) Hemmstoff-Nachweis in Blut, Milch und Harn nach intrauteriner Applikation von Nitrofurantoin-Abkömmlingen bei Kühen.
Dissertation, Tierärztliche Fakultät München.

- MCCALLA, D.R. (1979) Mechanism of action of antibacterial agents.
In: "Antibiotics", Vol. V
Part 1. (Hahn, E.F. ed.)
Springer-Verlag
- MEYER, V. (1980) Praxis der Hochleistungs-
flüssigkeitschromatographie.
Verl. Moritz Diesterweg,
Frankfurt a. M., Berlin,
München, 2.Aufl.
- MIURA, K. (1967) The nitrofurans.
In: "Progress in medicinal
chemistry", Vol. 5, 320-381
Ed.: Ellis, G.P. B.Sc. Ph.D.,
F.R.I.C. and West, G.B., B.
Pharm., D.Sc., Ph.D.
London/Butterworths
- MÜLLING, M. (1971) Sulfamethazin- und Furazolidon-
applikation über einen
Milchaustauscher bei gesun-
den Kälbern.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr.
84, 1-3
- HENNING, H.-J.
- NEGELE, R.N. (1974) Furoxon, ein Therapeutikum
zur Bekämpfung bakterieller
Fischkrankheiten.
In: "Die Furunkulose und
neuere Infektionskrankheiten
der Süßwasserfische". Bd. 25
Herausgeber: Liebmann, H.
R. Oldenbourg-Verlag, München,
Wien

- OJO, M.O.
AHANIHU, O. (1974) Minimum inhibitory concentration of furazolidone for *Escherichia coli* and *Salmonella* strains isolated in Nigeria.
Vet. Rec. 92, 172
- OLIVARD, J.
VALENTI, S.
BUZARD, J.A. (1962) The metabolism of 5-nitro-2-furaldehyde acetylhydrazone.
J. med. pharm. Chem. 5, 524-531
- OLIVE, P.L. (1978) Macromolecular, antineoplastic, and radiosensitization effects of nitrofurans.
In: "Carcinogenesis, a comprehensive survey". Vol. 4, Nitrofurans (Bryan, G.T. ed.). p. 131-169
- OMER, S. V.V. (1978) Efficacy and toxicity of furazolidone in veterinary medicine (a review).
Vet. Med. small Anim. Clin. 73, 1125-1132
- PAAR, G.E. (1962) Determination of nitrofurazone in milk.
J. agric. Fd Chem. 10, 291-293
- PALM, D.
MAGNUS, U. (1968) Hemmung der Monoaminoxidase und Diaminoxidase durch Furazolidon (Furoxon) - Pharmakologische und biochemische Untersuchungen am Menschen.
Klin. Wschr. 46, 720-727

- PANDY, S.N. (1978) Urinary excretion of furan-
BANERJEE, N.C. derivatives in goat.
SINGH, M.M. Indian vet. J. 55, 455-457
- PAUL, H.E. (1964) The nitrofurans - Chemothe-
PAUL, M.F. rapeutic properties.
In: "Experimental chemotherapy"
by SCHNITZER, R.J. and
HAWKIN, F.
Academic Press Inc., N.Y.
Vol. 2, Part I, 307-370
- PAUL, M.F. (1960) Studies on the distribution
PAUL, H.E. and excretion of certain
BENDER, R.C. nitrofurans.
KOPKO, F. Antibiotics and Chemotherapy,
HARRINGTON, C.M. (New-York) 10, 287-301
ELLS, V.R.
BUZARD, J.A.
- PERRY, S.C. (1972) The effect of furazolidone
HEBERT, T.J. on artificially induced Sal-
BRAEMER, A.C. monella typhimurium and Sal-
monella gallinarum infection
in chickens.
Poult. Sci. 51, 1645-1649
- PETZ, M. (1982a) Verfahren zur rückstandsana-
lytischen Bestimmung von Fu-
razolidon und vier weiteren
Nitrofuranen in Eiern, Milch
und Fleisch durch HPLC.
Dtsch. Lebensm. Rundsch. 78,
396-401

- PETZ, M. (1982b) Rückstandsanalyse von Furazolidon und vier weiteren Nitrofuranen in Eiern, Fleisch und Milch durch HPLC. Lebensmittelchem.Gerichtl. Chem. 36, 118
- PETZ, M. (1983a) Hochdruckflüssigchromatographische Rückstandsanalyse von Chloramphenicol, Furazolidon und fünf Sulfonamiden in Eiern, Fleisch und Milch. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 176, 289-293
- PETZ, M. (1983b) Rückstandsanalyse von Chloramphenicol und verschiedenen Sulfonamiden in Eiern, Milch und Fleisch durch HPLC. Lebensmittelchem.Gerichtl. Chem. 37, 43
- PETZ, M. (1984) Rückstände im Ei nach Behandlung von Legehennen mit Chloramphenicol und Furazolidon. Arch. Lebensmittelhyg. 25, 51-54
- PIETSCH, W. (1975) Zur Furazolidon-Intoxikation beim Kalb.
RÜFFLE, E. Mh. VetMed. 30, 855-859
RUMMLER, H.-J.
TROLLDENIER, H.
- PIETSCH, W. (1978) Untersuchungen zur Resorption von Furazolidon beim Saugkalb.
BELITZ, B. Mh. VetMed. 33, 366-369
TROLLDENIER, H.
MEISTER, B.

- POHLENZ, J.
SCHLATTER, CH.
NIEMACK, E.A.
JUCKER, H.
- (1976) Der Einfluß von Furazolidon auf das Blutbild und die Entwicklung von Mastkälbern. Proc. 3rd Meeting Acad. Soc. Large Anim. Vet. Med. (Zürich, Univ.,) 131-137
- RITCHIE, A.R.
CLEAR, M.H.
SOLLY, S.R.B.
- (1977) Improved gas-liquid chromatographic method for determining nitrofurantoin drug residues in animal tissues. N.Z. J. Sci. 20, 225-229
- ROBERT, H.D.B.
- (1958) The application of nitrofurans in veterinary medicine. MSU. Vet. (East Lansing) 19, 171-173
- ROSEBOOM, R.
KOSTER, H.A.
- (1978) The determination of nitrofurantoin and some structurally related drugs in biological fluids by high pressure liquid chromatography. Anal. Chim. Acta (Utrecht) 101, 359-365
- RYAN, J.J.
LEE, Y.C.
DUPONT, J.A.
CHARBONNEAU, C.F.
- (1975) A screening method for determining nitrofurantoin drug residues in animal tissues. J. Ass. off. analyt. Chem. 58, 1227-1231
- SCHWEIGHARDT, H.
LEIBETSEDER, J.
- (1979) Quantitative Furazolidonbestimmung mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) in Futtermitteln. Wien. tierärztl. Mschr. 66, 325-329

- SIDEROV, I.V. (1973) Effect of furazolidone on adrenal cortical function in the fowl.
(Englische Zusammenfassung)
Trudy Moskovskoj Vet. Akad. 65, 64-66
Ref. in: Vet. Bull. 44, 326
- SIDEROV, I.V. (1971) Untersuchungen des Plasmacorticosteronspiegels von Küken nach oraler Applikation von Furazolidon.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 78, 375-378
- LÜDERS, H.
- SINGH, V.K. (1968) Nitrofurans and antibiotic therapy of artificially induced swine salmonellosis.
J. Am. vet. med. Ass. 153, 65-68
- SMITH, H.W. (1972) The antibacterial activity of nitrovin in vitro: The effect of this and other agents against *Clostridium welchii* in the alimentary tract of chickens.
Vet. Rec. 11, 310-312
- STEPHAN, R. (1973) Die Entwicklung der Antibiotikaresistenz von Salmonellabakterien tierischer Herkunft in der Bundesrepublik Deutschland einschließlich Berlin (West).
2. Mitteilung: Jahresbericht 1971.
Zbl. Bakt. Abt.1, Orig. A 225, 257-262
- BULLING, E.

- STÖBER, M. (1970) Vergiftungen.
In: "Krankheiten des Rindes"
von Rosenberger, G.,
S. 1224-1225
Verlag P. Parey, Berlin und
München
- STONE, L.R. (1964) Determination of trace
amounts of nitrofurazone
in milk.
J. agric. Fd. Chem. 12, 121-123
- SUAREZ, M. (1980) Valoracion de diferentes dosis
de "Coccican" en el control de
la coccidiosis aviar.
(Trial of furazolidone at va-
rious doses to control cocci-
diosis in fowls).
Revista Avicultura, Cuba 24,
1-10
Ref. in: Vet. Bull. 51, 470
- SUGDEN, E.A. (1983) High pressure liquid chroma-
tographic determination of
nitrofurazone and furazoli-
done in chicken and pork
tissues.
J. Ass. off. analyt. Chem.
66, 874-880
- MACINTOSH, A.
VILIM, A.B.
- SWAMINATHAN, S. (1978) Biotransformation and excre-
tion of nitrofurans.
In: "Carcinogenesis, a com-
prehensive survey" (Bryan,
G.T. ed.). Vol. 4, p. 59-97
Raven Press, N.Y.
- LOWER, G.M.
- SZABO, S. (1968) Versuche zur medikamentösen
GÜNTHER, N. Vorbeugung gegen die Ödem-
krankheit bei Ferkeln.
Prakt. Tierarzt 8, 353-355

- TATSUMI, K.
TAKAHASHI, Y.
- (1982) Metabolic fate of furazolidone in rats.
Chem. Pharm. Bull. 30,
3435-3438
- TATSUMI, K.
KITAMURA, S.
YOSHIMURA, H.
- (1977) Binding of nitrofuran derivatives to nucleic acids and proteins.
Chem. Pharm. Bull. 25,
2948-2952
- TATSUMI, K.
YAMAGUCHI, T.
YOSHIMURA, H.
- (1973a) Metabolism of drugs. The metabolic fate of nitrofuran derivatives. Studies on enzymes in small intestinal mucosa of rat catalysing degradation of nitrofuran derivatives.
Chem. Pharm. Bull. 21, 622-628
- TATSUMI, K.
OU, T.
YAMAGUCHI, T.
YOSHIMURA, H.
- (1973b) Metabolism of drugs. LXXIX. The metabolic fate of nitrofur derivatives. (2). Degradation by small intestinal mucosa and absorption from gastrointestinal tract.
Chem. Pharm. Bull. 21, 191-201
- TENNENT, D.M.
RAY, W.H.
- (1971) Metabolism of furazolidone in swine.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 138, 808-810
- VEALE, H.S.
HARRINGTON, G.W.
- (1982) Determination of furazolidone in swine plasma using liquid chromatography.
J. Chromat. 240, 230-234

- VILIM, A.B.
MACINTOSH, A. (1979) High pressure liquid chromatographic determination of nitrofurazone in milk. J. Ass. off. analyt. Chem. 62, 19-22
- VREE, T.-B.
HEKSTER, Y.A.
BAARS, A.M.
DAMSMA, J.E.
KLEIJN, VAN DER, E. (1979) Determination of nitrofurantoin (Furadantine) and hydroxymethylnitrofurantoin (Urfa-dyn) in plasma and urine of man by means of high performance liquid chromatography. J. Chromat. 162, 110-116
- WALTER, A.M.
HEILMEYER, L. (1979) Antibiotika-Fibel 5. Auflage, George-Thieme-Verlag Stuttgart.
- WELZ, B. (1972) Atom-Absorptions-Spektroskopie Verlag Chemie GmbH (Weinheim)
- WINTERLIN, W.
HALL, G.
MOURER, C. (1981) Ultra trace determination of furazolidone in turkey tissues by liquid partitioning and high performance liquid chromatography. J. Ass. off. analyt. Chem. 64, 1055-1059
- WINTERLIN, W.
MOURER, C.
HALL, G. (1982) Furazolidone in turkey tissues following a 14-day feeding trial. Poult. Sci. 61, 1113-1117
- YAMAMOTO, H.
YAMAOKA, R. (1978) Residue of furazolidone in swine administered orally. Ann. Rep. Nat. Vet. Assay Lab. 15, 57-61
- N.N. (1968) Report of Edinburgh and East of Scotland Veterinary Investigation Service. Zitiiert nach FISHER und DE LA FUENTE.

Für die Überlassung des Themas sowie für seine wissenschaftliche Anleitung und stets bereitwillige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. W. Gedek herzlichst.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. HO Knöppler, dem Laboranten J. Neudegger für die umfassende Beratung bei der Versuchsdurchführung. Dem Labor-team danke ich für die unersetzbare Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. med. vet. P. Matzke danke ich ebenfalls für die freundliche Unterstützung.

LEBENS LAUF

Geburtstag: 20.09.1949

Geburtsort: Port-de-Paix / Haiti

Eltern: Antoine Kalim, Landwirt u. Kaufmann
Louisiane Kalim, geb. Moise

Familienstand: verheiratet seit 1978 mit
Renate Kalim, geb. Klitsch
Ein Sohn, Rolf Kalim

Schul Ausbildung: 1955 bis 1963 Volksschule in St. Louis
1963 bis 1969 Gymnasium in
Port-au-Prince, dort Abitur 1969

Hochschule: ab 1970 Ethnologie-Fakultät in
Port-au-Prince
ab Wintersemester 1978 Studium der
Veterinärmedizin an der Tierärzt-
lichen Fakultät der Ludwig-Maximi-
lians-Universität München
1983 Staatsexamen in München

Dissertation ab August 1983

Approbation Februar 1985

